

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Validation des inhibiteurs de la hyaluronidase 1

Lemonnier, Xavier

Award date:
2018

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Faculté des Sciences

Validation des inhibiteurs de la hyaluronidase 1

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Xavier LEMONNIER

Août 2018

Validation des inhibiteurs de la hyaluronidase 1

LEMONNIER Xavier

Résumé

L'acide hyaluronique ou HA est un composant important et essentiel de la matrice extracellulaire (MEC), en particulier de la MEC présente à la surface des cellules endothéliales : le glycocalyx endothélial. Ce polysaccharide de haut poids moléculaire est dégradé par une famille d'enzymes appelées les hyaluronidases. Des études antérieures réalisées dans notre laboratoire ont montré que la déficience en hyaluronidase 1 (HYAL1) - une des principales hyaluronidases présentes au niveau somatique - apporte une protection contre les complications vasculaires liées au diabète, dans un modèle de souris diabétiques, via un glycocalyx plus robuste. La déficience en HYAL 1 préserve la barrière de filtration glomérulaire ainsi que la fonction endothéliale médiées par l'hyperpolarisation des cellules endothéliales, premières étapes dans le développement des complications micro- et macro-vasculaires. L'inhibition de HYAL1 a donc été proposée comme une cible thérapeutique pour ralentir le développement des complications vasculaires du diabète. De même l'inhibition de HYAL1 est proposée comme cible thérapeutique dans certains cancers où le caractère invasif de la tumeur a été mis en relation avec une surexpression de HYAL1 et l'augmentation de production de HA de faible poids moléculaire qui favorise la synthèse de métalloprotéases, l'angiogenèse et la migration des cellules tumorales. Le but de cette étude est de mesurer les capacités d'inhibition de HYAL1 (forme recombinante humaine) par quelques inhibiteurs connus des hyaluronidases, comme l'acide glycyrrhizique (GA), l'acide L ascorbique 6 palmitate (Vc pal) et l'héparine. Ainsi que la capacité d'inhibition de nouveaux inhibiteurs potentiels comme des HA sulfatés (HA-S) de différents poids moléculaires : 13 et 350 kDa portant une chaîne palmitate, des hexamères de HA-S portant une chaîne palmitate (HA6-S C16) ou béhénate (HA6-S C22) et l'hyaluromycine. Les différents inhibiteurs ont été testés au travers de trois techniques de mesure de l'activité hyaluronidasique : le test de Reissig, la zymographie et l'électrophorèse de fragments de HA résultants de la digestion. Ce travail a permis de démontrer l'efficacité des inhibiteurs via le test de Reissig et la zymographie. Parmi les inhibiteurs dont nous disposons, seul le HA6-S C16 n'a pu être validé en tant qu'inhibiteur de HYAL1 ; par contre GA, Vc pal, l'héparine, HA-S 350 kDa, HA-S 13 kDa, le HA6-S C22 et l'hyaluromycine ont montré une diminution dose- dépendante de l'activité de la rhuHYAL1. Des mesures supplémentaires sur l'aspect fonctionnel du glycocalyx en cultures cellulaires sont à prévoir afin de sélectionner le meilleur inhibiteur et analyser, en cristallographie, l'interaction entre l'enzyme HYAL1 et celui-ci.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Août 2018

Promoteur: B. Flamion

Table des matières

Abréviations	4
Introduction	6
L'acide hyaluronique	6
Structure de l'acide hyaluronique	6
Synthèse du HA	7
Dégradation du HA	8
Rôles et fonctions du HA.....	11
Maladie en association avec la Hyal 1	14
Le diabète	14
Le cancer	16
Projet	19
Matériel et méthode	21
Hyaluronidase 1 humaine recombinante.....	21
Culture cellulaire et lysat.....	21
Test de Reissig.....	21
Zymographie renaturante	22
Zymographie native	23
Zymographie inverse.....	23
Migration de fragment de HA après digestion par la hyaluronidase	24
Analyse statistique.....	26
Résultats	27
Mise au point du test de Reissig pour mesure l'activité de l'Hyal1	27
Inhibition de l'activité de HYAL1 par l'acide glycyrrhizique et l'acide L-ascorbique hexadécanoate via le test de Reissig.....	28
Capacité inhibitrice d'oligosaccharides de HA sulfaté (13 et 350 kDa) et hexamères de HA sulfatés.....	30
Analyse de la capacité inhibitrice de l'héparine et la hyaluromycine	30
Analyse par zymographie de l'activité de la rhuHYAL1.....	32
Mesure de l'inhibition de l'activité de rhuHYAL1 par l'acide glycyrrhizique et l'acide ascorbique 6 palmitate en zymographie.....	32
Mesure de l'inhibition de l'activité HYAL1 par les HA-palmitate sulfatés (13 et 350 kDa) en zymographie.....	35
Mesure de l'inhibition de l'activité HYAL1 par les hexamères de HA sulfatés en zymographie	35
Mesure de l'inhibition de l'activité HYAL 1 par l'héparine en zymographie	38
Mesure de l'inhibition de l'activité HYAL1 par l'hyaluromycine en zymographie.....	38

Test des inhibiteurs sur l'activité HYAL1 endogène de cellules T47D	38
Analyse de l'inhibition de la rhuHYAL1 par zymographie inverse	39
Analyse de l'activité hyaluronidase par électrophorèse de fragments d'oligosaccharides de HA après digestion	40
Discussion	42
Mise au point	42
Test de Reissig	42
Zymographie	42
Migration de fragments de HA post digestion	43
Inhibition de l'activité de HYAL1	43
L'acide glycyrrhizique (AG)	44
L'acide L ascorbique 6 palmitate (Vc pal).....	44
Les HA sulfatés 13 kDa, 350 kDa et hexamère palmitate et hexamère de HA-sulfaté béhénate	44
L'héparine	45
L'hyaluromycine	45
L'effet des inhibiteurs sur le lysat cellulaire de cellules T47D.....	46
Perspectives	46
Bibliographie	48

Abréviations

a.a. : acide aminé

Akt : protéin kinase B

BHT : hyaluronidase bovine testiculaire

CS : chondroïtine sulfate

DMAB : p-diméthylaminobenzaldehyde

DS : dermatane sulfate

EC : cellule endothéliale

GA : acide glycyrrhizique

GAG : glycosaminoglycan

Glc-Ac : acide glucuronique

Glc-Nac : N acétylglucosamine

HA : Hyaluronan / acide hyaluronique

HARE : stabiline-2 (HA receptor for endocytosis)

HAS : hyaluronan synthase

HMW-HA : HA de haut poids moléculaire

HS : heparan sulfate

HYAL : hyaluronidase

IC50 : concentration inhibitrice à 50%

KS : keratan sulfate

LMW-HA : HA de faible poids moléculaire

Lyve 1 : lymphatic vessel endothelial receptor-1

MEC : matrice extracellulaire

MMP : métalloprotéase

PIC : Protease Inhibitor Cocktail

ROS : espèce réactive de l'oxygène

T1DM : diabète de type 1

T2DM : diabète de type 2

UDP : uridine diphosphate

Vc pal : acide L ascorbique 6 palmitate / vitamine c palmitate

Introduction

L'acide hyaluronique

Structure de l'acide hyaluronique

L'acide Hyaluronique (HA) est un des nombreux glycosaminoglycans (GAG) qui est synthétisé par les organismes vivants. Dans cette famille de macromolécules que sont les GAGs on peut également retrouver : le chondroïtine sulfate (CS), le dermatane sulfate (DS), le kératane sulfate (KS) et l'héparane sulfate (HS). Ce sont des molécules linéaires construites par l'assemblage d'hexoses modifiés. Les GAGs se retrouvent de façon abondante au sein des tissus conjonctifs des vertébrés et dans la matrice extracellulaire (ECM).

Une caractéristique commune de tous les GAGs est la répétition d'unités disaccharidiques formant de longues chaînes pouvant, pour la plupart, former des ramifications. L'unité dissaccharidique est composée d'un sucre (hexose) dont une des fonctions est remplacée par une fonction amine (hexosamine), comme la N-acétylglucosamine ou la N-acétylgalactosamine, et d'un acide uronique, sucre dont le dernier carbone est oxydé, comme l'acide D-glucuronique ou L-iduronique. En plus des nombreuses possibilités de ramifications, les chaînes peuvent être sulfatées et/ou phosphorylées augmentant alors le panel de GAGs pouvant être formés à partir d'unités disaccharidiques.

L'acide Hyaluronique ou hyaluronan (HA) est un GAG composé d'acide glucuronique (Glc-Ac) et de N acétylglucosamine (Glc-Nac) liés entre eux par un lien $\beta 1-3$. Les unités disaccharidiques sont liées entre elles par un lien $\beta 1-4$ (Figure 1). Le HA est une molécule très répandue, au sein du vivant on peut le trouver synthétisé par des organismes allant de la bactérie, comme *Streptococcus equisimilis*, jusqu'aux eucaryotes les plus complexes comme les vertébrés, chez qui le HA est présent dans les fluides corporels et des tissus (1). Contrairement aux autres GAGs, Le HA n'est ni sulfaté, ni ramifié ; de plus il ne forme pas de liens covalents avec les protéines comme c'est des autres GAGs : le CS, le DS, le KS et le HS. A pH physiologique, le HA présente une charge négative (2).

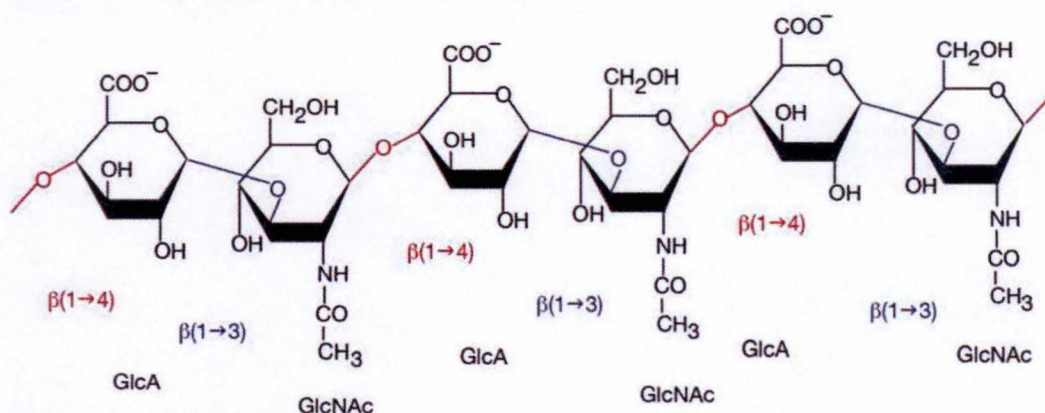


Figure 1 : Structure du Hyaluronan. Le HA est composé d'acide glucuronique (Glc-Ac) et de N acétylglucosamine (Glc-Nac) liés entre eux par une liaison $\beta 1-3$. Les unités disaccharides sont liées entre elles par une liaison $\beta 1-4$

Synthèse du HA

Contrairement aux autres GAGs, le HA n'est pas synthétisé au sein de l'appareil de Golgi mais dans la membrane cellulaire par les Hyaluronan Synthases (HAS). Au sein du génome humain on retrouve plusieurs isoformes de l'enzyme qui sont au nombre de trois : HAS 1, HAS 2 et HAS 3 (1-3). Les trois isoformes humaines partagent de 55 à 71% d'homologie. Les HAS constituent une famille d'enzymes fortement conservée au travers de l'évolution ; séquence aminée des 3 isoformes humaines de HAS sont semblables à celle que l'on retrouve chez la grenouille (49% d'homologie) et présentent 25% d'homologie avec HAS de *Streptococcus pyogenes* (HasA) (4). Ainsi, leur structure tertiaire est fortement similaire : elles disposent de 7 domaines transmembranaires, deux au niveau de l'extrémité N terminale et cinq au niveau de l'extrémité C terminale. La boucle cytoplasmique située entre ces domaines contient un domaine reconnaissant l'uridinediphosphate (UDP) et qui exerce l'activité glycosyltransférase qui permet de transférer un sucre sur la chaîne en élévation du HA (Figure 2).

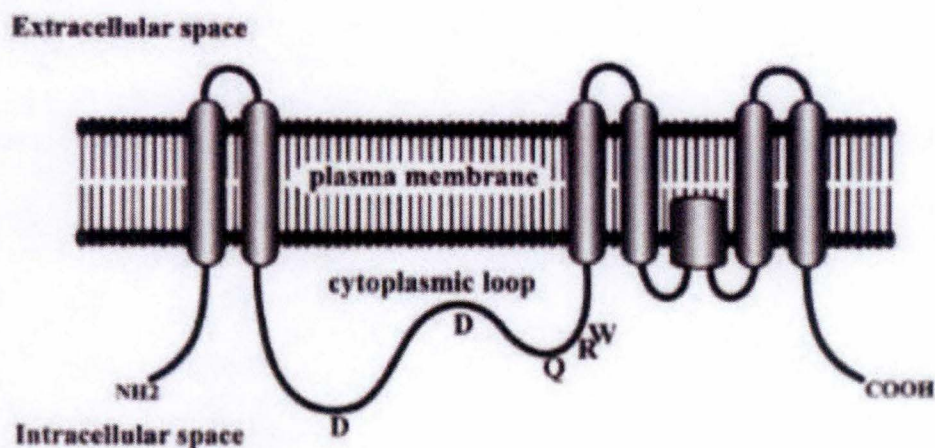


Figure 2 : Structure et disposition des HA Synthases (HAS) dans la membrane plasmique. Les HAS possèdent 7 domaines transmembranaires, deux localisés au niveau de l'extrémité N-terminale et cinq au niveau de l'extrémité C-terminale. Un domaine glycosyltransférase est présent au niveau de la boucle cytoplasmique. (N. Itano et K. Kimata Life 2002)

Ces trois enzymes forment des pores au sein de la membrane plasmique par lesquels sera extrudé le HA (figure 3). La synthèse du HA consiste en l'élévation de la molécule directement vers l'extérieur de la cellule, par l'addition en alternance d'une Glc-Nac et d'un Glc-A. La polymérisation est permise grâce à l'activation des sucres via la liaison d'un groupement UDP qui sera libéré lors de l'ajout du sucre sur la chaîne en élévation.

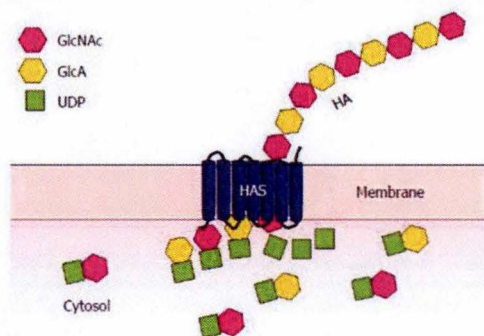


Figure 3 : Représentation de l'élévation de la chaîne oligosaccharidique et extrusion de la molécule de HA vers l'extérieur de la cellule lors de sa synthèse (B. Triggs-Raine et M. R Natowicz, World J BiolChem. 2015)

Bien qu'assurant la même fonction, les trois isoformes se comportent différemment puisqu'elles ne sont pas exprimées aux mêmes stades du développement et ne produisent pas des chaînes de HA de même longueur :

- HAS 1 a l'affinité la plus faible pour ses substrats mais produit de longues chaînes de HA allant de 2×10^5 à 2×10^6 Da (3). Cette isoforme est surexprimée, par exemple, lors de l'inflammation associée à l'arthrite rhumatoïde (1).
- HAS 2 synthétise des chaînes de HA aussi longues que celles produites par HAS 1, mais a une plus grande affinité pour ses substrats (3). Cette isoforme est la plus exprimée durant l'embryogenèse. La perturbation de l'expression de cette isoforme conduit à des malformations cardiaques et sa surexpression provoque des malformations des membres (1, 5,6).
- HAS 3 présente une affinité pour ses substrats similaire à celle de HAS 2 mais produit des chaînes de HA plus courtes de 1×10^5 à 1×10^6 Da (3). Cette isoforme est la plus active au sein des tissus somatiques (5).

Le HA est présent dans plusieurs parties du corps dont la peau (50%), le squelette (25%) ainsi que dans le cerveau, poumons, reins et muscles. Mais on le retrouve majoritairement dans les tissus mous comme la peau ainsi que dans les liquides interstitiels comme le fluide synoviale et le corps vitreux au niveau de l'œil (5). Les conséquences visibles chez l'homme d'une augmentation de la synthèse du HA sont une peau épaissie au niveau du tronc ainsi qu'une augmentation des replis de la peau au niveau du visage et des membres qui s'atténuent avec l'âge. On retrouve également des taux 1000 fois supérieurs de HA dans le sérum. On peut retrouver ce phénotype également chez le shar-pei, une race de chien, sélectionné par élevage pour leur peau pressant de nombreux replis. Ces chiens pressentent un taux très élevé d'ARN messagers codant pour HAS2 (5).

Le turn over du HA est assez rapide car plus ou moins un tiers du HA contenu dans le corps est renouvelé chaque jour, mais en fonction de sa localisation son temps de demie vie diffère largement : 2 à 5 minutes dans le sang ; 2,5 jours dans la peau et 18 jours au niveau du cartilage où il est lié à l'aggrecan, protéine majeure de la MEC du cartilage portant des carbohydrates (protéoglycan) (5).

Dégradation du HA

La dégradation du HA est assurée par une famille d'enzymes appelée Hyaluronidases (HYAL). Tout comme on retrouve le HA du plus simple procaryote aux vertébrés, les hyaluronidases sont déjà présentes dans le venin d'animaux tel que les serpents, scorpions et guêpes où elles jouent le rôle de facteur de propagation des toxines en dégradant la matrice extracellulaire au lieu d'injection (6). Ce système est également utilisé par les micro-organismes afin d'investir les tissus de l'hôte (7). Les hyaluronidases sont réparties en trois groupes en fonction de la façon dont elles clivent le HA : 1) les Hyaluronate 4-glycanohydrolases, dont l'hyaluronidase testiculaire bovine (BHT), HYAL1 et la hyaluronidase contenue dans le venin d'abeille (Api M2) ; 2) Les Hyaluronate 3-glycanohydrolases, famille dans laquelle on trouve les hyaluronidases produites par les sangsues et 3) les hyaluronates lyases qui sont des

hyaluronidases produites par des bactéries comme *Streptococcus pneumoniae* ou *Streptomyces koganeiensis* (6-8).

Dans le génome humain, six gènes codent pour des hyaluronidases. Ces gènes sont regroupés en deux clusters : HYAL1, HYAL2 et HYAL3 localisées sur le chromosome 3p21.3 et HYAL4, PH-20 et HYALP qui sont sur le chromosome 7q31.3 (9). Parmi ces six gènes, seuls HYAL1, HYAL2 et HYAL3 sont actives dans le métabolisme du HA au niveau somatique. L'HYAL 2 est une enzyme membranaire capable de dégrader les longues chaînes de HA. Quant à l'HYAL3, souvent rapportée comme inactive, elle semble intervenir lorsque HYAL1 n'est pas en mesure d'assurer sa fonction catalytique et jouerait un rôle dans la régulation des cellules souches. De plus HYAL 3 semble participer à la dégradation en tant que partenaire de HYAL1. En effet, on constate une augmentation de l'activité de HYAL1 en présence de HYAL3 (9-11). HYAL 4 ne semble être exprimée qu'au sein du placenta et agit en tant que chondroïtinase, HYALP1 est une protéine exprimée par un pseudogène n'exerçant aucune activité de dégradation suite à des mutations induisant un codon stop prématuré (9). La PH-20 est une hyaluronidase intervenant dans la fécondation, ancrée via une ancre GPI sur la face externe de la membrane plasmique du spermatozoïde, au sein de l'acrosome (9).

HYAL 1 est une enzyme lysosomiale exprimée sous forme de précurseur (52 kDa) qui sera sécrétée à partir du Golgi vers le milieu extracellulaire (12). Par la suite elle sera endocytée afin de parvenir au lysosome où elle sera clivée pour être active sous sa forme mature (48kDa). HYAL1 est présente dans le sérum sous forme précurseur (où elle est inactive à pH physiologique) et est exprimée également dans le foie, le cœur, les reins et les poumons. Le système de sécrétion-recapture est un moyen de s'assurer que le plus grand nombre de cellules disposent de l'enzyme (13). Lors de son endocytose par la cellule, l'HYAL 1 n'emprunte pas la voie classique du mannose phosphate- l'inhibition de cette voie n'empêche pas la recapture de l'enzyme ; néanmoins, la perte de cette modification post-transcriptionnelle remplacement du mannose par du mannan- perturbe la recapture de l'enzyme (Figure 4). Après recapture, HYAL1 sera clivé au sein du lysosome afin de générer une enzyme active (48 kDa) à pH 3.7 (12 ; 13).

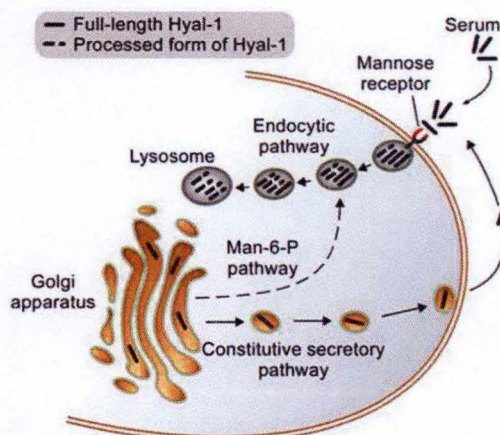


Figure 4 : Schéma de l'endocytose de HYAL1 via la voie du mannose 6 phosphate. HYAL1 est excrété sous forme de précurseur dans le sérum puis recapturée via le récepteur Mannose phosphate. Après endocytose, HYAL1 est clivée pour être active au sein du lysosome. Puissant E. et al, Traffic, 2014

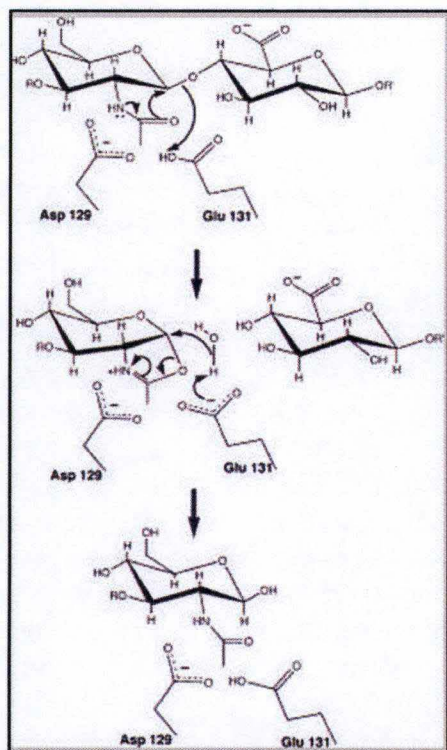


Figure 5 : Mécanisme de dégradation du HA par HYAL1. (Ling Zhang et al., J Biol Chem 2009)

Cinq acides aminés (a.a.) sont critiques pour l'activité de HYAL 1: Asp129, Glu131, Tyr202, Tyr 247, Ser245 et Arg265. L'Asp 129, le Glu 131 et la Tyr 247 forment le site catalytique. En effet, l'enzyme est active à un pH optimum d'environ 3.7-3.8, l'Asp 129 et le Glu 131 se partagent un proton, ce qui permet d'initier la dégradation du HA. Durant la catalyse, le lien amide du Glc-Nac entre en résonance, déplaçant alors la double liaison de l'oxygène, ce qui induit la formation d'un cycle sur le Glc-Nac permettant la libération du C4 du Glc-Nc. Cette réaction va créer une charge négative sur le carbonyle du Glu 131 et charger positivement l'azote de Glc-Nac. Cet état intermédiaire est stabilisé par l'Asp 129 et la Tyr 247 durant l'attaque du carbanion sur une molécule d'eau pour produire un ion hydroxyde qui s'attaquera au C1 du GLc-Nac, ce qui permet de régénérer le sucre à son état antérieur à la catalyse comme le montre la figure 5 (11).

La mutation de Glu 131 induit la perte de l'activité de l'enzyme ; il en est de même pour Tyr 247. La mutation de l'Asp 129, elle, n'est pas critique pour l'enzyme car elle reste significativement active, mais impacte l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Trois acides aminés sont essentiels pour garantir l'affinité de la HYAL1 à son substrat : la Tyr 202, la Ser 245 et la Ser 265. Lorsque l'un de ces a.a. est muté, l'affinité de HYAL1 pour son substrat diminue de trois à dix fois car l'enzyme n'est plus en mesure de lier le HA (11).

HYAL1 possède deux caractéristiques au niveau de sa structure tertiaire : les ponts disulfures et la N-glycosylation. Elle dispose de cinq sites pouvant former un pont disulfure. Néanmoins, quand l'enzyme est traitée au DDT, elle conserve son efficacité et son affinité pour le substrat. Parmi les trois sites de N-glycosylation, un seul est essentiel : l'Asparagine 350. En effet, lorsque l'enzyme est déglycosylée sur l'Asp350, elle perd son activité proportionnellement au temps de traitement. Enfin, le domaine EGF-like permet à l'enzyme d'être sécrété. (11 ; 12).

Le HA est majoritairement dégradé en trois lieux : 1) localement par le tissu producteur (30%), 2) au niveau des ganglions après avoir été filtré et acheminé par la lymphe (63%) 3) au niveau du foie après filtration et acheminement par le sang (7%) (5 ; 14).

Le modèle actuel pour la dégradation du HA est le suivant : Le HA présent dans le milieu extérieur est capturé par les récepteurs HARE (HA receptor for endocytosis ou stabiline-2), Lyve 1 (lymphatic vessel endothelial receptor-1) ou encore le CD-44 qui sont les principaux récepteurs du HA (4). Le HA lié à un récepteur formera alors un complexe avec HYAL2, présent en membrane, et NHE1 (pompe Na^+/H^+ qui acidifie localement le milieu). La pompe

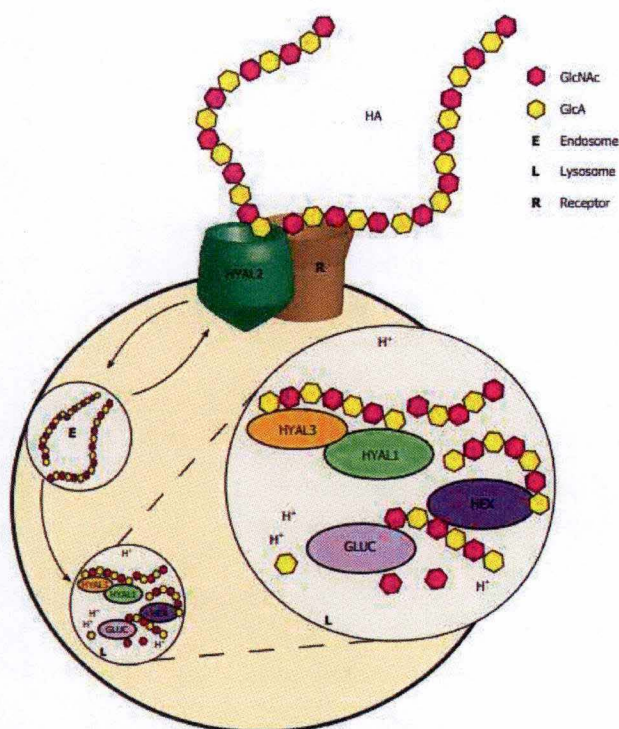


Figure 6 : Modèle théorique de la dégradation du HA au niveau cellulaire ; implication du CD44 et HYAL2 en membrane ; puis HYAL1 dans le lysosome. (B. Triggs-Raine et M. R Natowicz, World J BiolChem. 2015)

Na^+/H^+ crée alors un environnement favorable à l'activité de HYAL2 qui clive le HA en fragments de 20 kDa. Ces fragments sont ensuite endocytés et conduits au lysosome, où HYAL1 poursuit le clivage en tétrasaccharides. La dégradation complète du HA est finalisée par l'action de deux autres enzymes présentes dans le lysosome : la β -glucuronidase (Gluc) et la β -N-acetylhexosaminidase (Hex) qui clivent, respectivement les Glc-Ac et Glc-Nac terminaux (Figure 6) (5).

Tout comme la perte des synthases peut s'avérer délétère, la perte de HYAL1 et HYAL2 peut mener à des troubles de santé. Ainsi, une déficience en HYAL1, qui a pu être observée chez un patient isolé dans un premier temps et décrite chez 3 personnes par la suite, conduit à l'apparition de la mucopolysaccharidose IX. La mucopolysaccharidose IX est une

maladie de surcharge lysosomiale qui se manifeste par un retard de croissance des tissus intra et périarticulaires, une dysmorphie faciale légère, la formation de masses bilatérales péri- ou intra-articulaires et une production élevée de synovie riche en macrophages ainsi qu'un taux élevé de HA sanguin (9 ; 15) Un modèle de mucopolysaccharidose IX a été analysé chez la souris déficiente en HYAL1 qui ne présente pas l'accumulation de HA visible chez l'homme, mais une détérioration progressive, à partir de 3 mois, des protéoglycans au niveau du cartilage de l'articulation du genou. Le phénotype intermédiaire serait dû à la compensation de l'activité de HYAL1 par les β -hexosaminidases A et B (5). Chez les souris déficientes en HYAL2 (KO HYAL2), on peut observer une augmentation drastique de HA plasmatique (concentration plasmatique 10 fois plus élevée que chez la souris sauvage (WT) ainsi que des malformations crânio-faciales et vertébrales, ainsi que de la micro angiopathie (15). Au sein de la cellule HYAL2 est l'enzyme limitante de la voie de dégradation du HA. En effet, lorsque cette enzyme n'est plus ou pas fonctionnelle, on observe une diminution de l'endocytose du HA ainsi que son accumulation au sein des vaisseaux lymphatiques et des ganglions menant à leur déformation (9 ; 14).

Rôles et fonctions du HA

Le HA se trouve sous différentes tailles au sein de l'organisme, généralement regroupées en deux catégories : Le HA de haut poids moléculaire (HMW-HA) et le HA de faible poids moléculaire (LMW-HA). La taille du HA est un facteur important car elle induit des mécanismes différents. Ainsi, le HMW-HA favorise la migration cellulaire et inhibe la

réponse inflammatoire (15). Chargé négativement, il assure également l'humidification des tissus ainsi que la lubrification des articulations par sa capacité à retenir une quantité importante de molécules d'eau. (15).

Le HMW-HA est un élément majeur dans la formation de structures comme la matrice extracellulaire, qui sert de support aux tissus et guide la migration cellulaire. Enfin, Il est également un composant majeur-et essentiel- du glycocalyx endothélial, couche composée de GAGs, de protéoglycans, et molécules d'adhésions et plasmatiques, couvrant la surface luminale des cellules endothéliales (Figure 7, A) (16-18). La structure du glycocalyx n'est pas homogène, il est composé de HA, de HS de CS ainsi que des protéines plasmatiques. Le HS y joue un rôle de structure, la CS, proche de la membrane cellulaire, avec l'aide du HA participant à la filtration au travers du glycocalyx (16) (Figure 7, B).

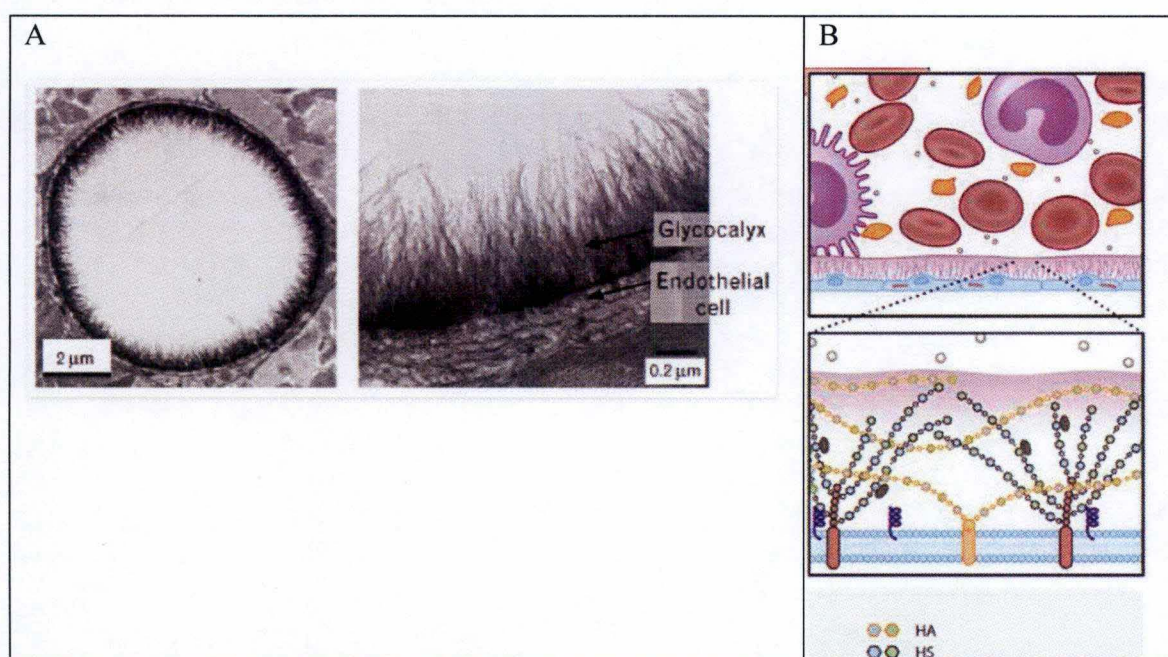


Figure 7 : Visualisation du glycocalyx endothélial. A) Photo en microscopie électronique du glycocalyx endothélial d'un capillaire coronarien (Robertson & Watton, *Transport in Biological Media* 2013, Pages 275-347). B) Schéma représentant la composition du glycocalyx endothélial (Daneet *al*, *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015).

Le glycocalyx endothélial est plus dense du côté cellulaire sans doute suite à la synthèse élevée de HA vers le milieu extracellulaire et plus fin du côté luminale du glycocalyx suite au shear stress qui provoque le shedding du glycocalyx au fur et à mesure (17). Le glycocalyx assure plusieurs fonctions que l'on peut réunir en quatre catégories (19) :

- La perméabilité : le glycocalyx forme un maillage serré et chargé négativement empêchant les protéines et les fluides de passer de la lumière vers le tissu interstitiel (protéinurie et œdème)
- La formation d'une frontière entre le sang et l'endothélium : le glycocalyx protège les cellules endothéliales du shear stress induit par le passage continu du sang et empêche les leucocytes d'adhérer à la surface de l'endothélium

- La régulation du microenvironnement : le glycocalyx a la capacité de retenir des protéines présentes dans le plasma sanguin. Parmi elles, on peut retrouver l'antithrombine III et la thrombomoduline (facteur antithrombotique). On y retrouve aussi des cytokines, limitant les réponses inflammatoires ainsi que la superoxyde dismutase qui limite l'impact des espèces réactives de l'oxygène (ROS)
- La mécanotransduction : de par ses interactions avec le cytosquelette et sa position dans la lumière du vaisseau, en contact direct avec le flux sanguin, le glycocalyx permet la transmission d'un signal depuis l'extérieur de la cellule, vers l'intérieur de la cellule. Par exemple, sa présence est liée à l'orientation des cellules endothéliales (ECs) dans le sens du flux, à la régulation de la prolifération des ECs ainsi qu'à la régulation du tonus vasculaire suite à la production d'oxyde nitrique.

Le HA, en outre, est essentiel dans le maintien des jonctions cellulaires. En effet, le HMW-HA présent au sein du glycocalyx se lie à ses récepteurs CD44 présent au sein de microdomaines riches en cavéoline (les cavéoles). La liaison du HA avec le récepteur induit plusieurs effets, 1) le recrutement de la voie Akt (protéine kinase B) qui favorise le maintien de l'actine corticale, 2) l'activation de l'annexine A2, dont la résultante est l'activation des protéines structurant l'actine corticale. L'activation de ces deux voies renforce et favorise la formation de l'actine corticale qui est nécessaire dans l'organisation des jonctions serrées et adhérentes entre les cellules endothéliales (20).

Lors d'une inflammation, le HMW-HA forme des ultrastructures- notamment dans la synovie des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, une surproduction de HA par exemple suite à une inflammation ou à une hyperglycémie induit la formation de câbles, maintenus par l'addition de l'inter-alpha trypsin inhibitor (I α I). Cette structure à un effet anti-inflammatoire car les câbles de HA ont la propriété de capturer les leucocytes, empêchant ces derniers d'avoir accès à la zone touchée (21).

Par contre, le LMW-HA montre des effets opposés à ceux du HMW-HA. Le HMW-HA est la forme la plus présente dans des conditions saines, alors que le LMW-HA se retrouve principalement en conditions pathologiques suite à la dégradation du HMW-HA. Le LMW-HA est considéré comme un DAMP (Damage-associated molecular pattern) qui est un des deux éléments nécessaires à l'activation de la réponse inflammatoire et immunitaire. Certains pathogènes disposent de hyaluronidases afin de dégrader la MEC et ainsi pouvoir se propager plus facilement au sein des tissus de l'hôte (22). Le LMW-HA, produit lors de l'inflammation, induit la production de cytokines inflammatoires, qui à leur tour induisent la production de LMW-HA par la génération de ROS créant une boucle d'amplification (20).

Le LMW-HA impacte le maintien des jonctions cellulaires et provoque leur disruption. En effet, le LMW-HA se lie au récepteur CD44 et active les protéines RhoA et ROCK (Rho kinase) qui provoquent la formation de fibres d'actine de stress. Cette voie est également activable indépendamment du CD44 : le LMW-HA peut activer HABP2 qui par le biais de la protéine PAR (protease-activated receptor) localisée en membrane, enclenche la voie signalétique de RhoA et ROCK. Ces deux voies activées, conduisent à la perte d'intégrité de l'endothélium responsable de la formation d'œdème. Cette perte d'intégrité vasculaire confère au LMW-HA des propriétés angiogéniques (20, 23).

Maladie en association avec la Hyal 1

Le diabète

La croissance économique rapide des pays en voie de développement depuis quelques décennies conduit à des changements du comportement alimentaire et des habitudes de vie, augmentant le risque de développement de maladies telles que l'obésité et le diabète (24). La prévalence du diabète augmente de plus en plus chaque année, devenant une pandémie du monde moderne. De plus, outre les pays développés comme c'est le cas en Europe ou les USA, le diabète touche également l'Afrique où plus des deux-tiers des personnes atteintes ne sont pas diagnostiquées. En 2015, le nombre de personnes décédées suite au développement de la maladie s'élevait à 5 millions et le nombre de personnes atteintes à travers le monde est évalué à 425 millions (2017). L'organisation mondiale de la santé (OMS) et la fédération internationale du diabète (IDF) prévoient une évolution alarmante pour 2040 avec plus de 622 millions de personnes atteintes, soit une augmentation du nombre de patients de 48% (25-26).

Le diabète est une maladie qui se caractérise par une hyperglycémie supérieure à 1.26 g/L (126 mg/dl) lorsque le patient est à jeun. On peut distinguer trois formes principales de diabètes :

- Le diabète de type I (T1DM) ou diabète sucré, caractérisé par un manque de production d'insuline. Cette forme de diabète touche majoritairement les jeunes et adolescents
- Le diabète de type II (T2DM) ou diabète non insulino-dépendant, se diagnostique majoritairement chez les personnes de plus de 50 ans. Il est lié à l'obésité et représente près de 90% des cas de diabètes diagnostiqués
- Le diabète gestationnel

Le diabète de type 1 (T1DM)

Le T1DM se caractérise par une destruction, suite à une réaction auto-immune, des cellules β , productrice d'insuline, des îlots de Langerhans localisés au sein du pancréas. Faute des cellules β , les patients diabétiques de type 1 sont incapables de réguler seuls leur glycémie. On peut trouver des marqueurs de la destruction auto-immune par la détection d'anticorps contre les cellules β ou contre l'insuline.

Encore aujourd'hui, les mécanismes conduisant à l'attaque des cellules β par le système immunitaire ne sont pas encore compris. Mais il est supposé que la combinaison de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux seraient déclencheurs de la maladie. Parmi ces facteurs déclencheurs, on peut retrouver une infection virale, des toxines ou encore des facteurs alimentaires (26).

Le diabète et les hyperglycémies s'accompagnent de symptômes caractéristiques de la maladie : une soif excessive (polydipsie) et la bouche sèche, des urines abondantes (polyurie), de la fatigue (asthénie), une faim constante (polyphagie), une perte de poids rapide et soudaine, des infections plus fréquentes, l'incontinence nocturne et une vision trouble. L'incidence du diabète de type 1 augmente partout sur le globe. Certaines régions du monde étant plus touchées que d'autres. Tout comme les facteurs déclencheurs de la maladie, on suppose que les éléments pouvant expliquer l'augmentation de cette incidence soit également d'origine génétique, combinée à des facteurs environnementaux.

Le T1DM est incurable, et les patients ont besoin de d'injection régulière d'insuline afin de maintenir leur glycémie à un seuil acceptable. Un mode de vie sain et une alimentation saine, en ayant accès à de l'insuline et une surveillance régulièrement de la glycémie, permet aux patients diabétiques de vivre de façon correcte et de limiter le développement de complications liées au diabète.

Le diabète de type 2 (T2DM)

Contrairement au T1DM, la production d'insuline n'est pas déficiente mais l'organisme n'est pas capable de répondre correctement à l'insuline, ce qui conduit à un état appelé la résistance à l'insuline.

Le diagnostic du T2DM est similaire à celui du T1DM, et présente des symptômes similaires : une soif excessive (polydipsie) et la bouche sèche, des urines abondantes (polyurie), une faim constante (polyphagie), une perte de poids rapide et soudaine, des infections récurrentes, de la fatigue (asthénie), une vision trouble, un engourdissement des mains et des pieds et une difficulté de cicatrisation. Le diagnostic est plus difficile à poser car la maladie prend beaucoup de temps pour se déclarer. De nombreux cas de T2DM restent donc non diagnostiqués, ce qui laisse le temps aux complications liées aux hyperglycémies répétées de se développer

Les causes du T2DM ne sont pas totalement connues mais semblent liées aux conditions de vie. Ainsi une adiposité abdominale excessive (obésité), une mauvaise hygiène de vie - que ce soit le sédentarisme (manque d'activité physique) ou les mauvaises habitudes alimentaires - sont des éléments prépondérants dans l'étiologie de la maladie. Le tabagisme, une exposition au diabète gestationnel qui a exposé le fœtus à une glycémie élevée sont également des facteurs de risques connus. De plus, la consommation excessive de sucre (dans les aliments et boissons) tend à augmenter les probabilités de développer cette maladie.

Le T2DM touche principalement les adultes (>40 ans), mais on constate de plus en plus de jeunes enfants et adolescents atteint de T2DM probablement suite aux conditions de vie adoptées par la majorité de la population.

Tout comme pour le T1DM, l'adoption d'un mode de vie sain, au niveau alimentaire et des habitudes de vie (sport, arrêt du tabac, *etc.*), combinée à la régulation de la glycémie permet aux patients atteint du T2DM de vivre en limitant les risques de développer des complications associées au T2DM.

Diabète gestationnel

Cette forme de diabète apparait durant la grossesse et se déclare majoritairement durant le second et troisième trimestre. Il peut apparaître suite à une résistance à l'insuline liée à la production d'hormone par le placenta. Les facteurs de risque pour cette forme de diabète sont : un surpoids chez la mère, l'âge avancé de la mère ou encore une prise de poids importante durant la grossesse.

Bien que disparaissant après l'accouchement, il n'est pas sans conséquences. En effet, chez la mère, le développement de cette maladie augmente le risque de déclarer un diabète

gestationnel durant les grossesses suivantes. Le diabète gestationnel augmente aussi le risque de contracter le T2DM, dans les 5 à 10 ans suivant l'accouchement. Chez l'enfant, le diabète gestationnel augmente également les risques de développer le T2DM ainsi que le risque d'obésité.

Le HA et HYAL1 chez les diabétiques

Parmi les complications imputables au diabète, on peut observer des complications microvasculaires : des problèmes rénaux, de la rétinopathie, de la neuropathie et des complications macrovasculaires comme l'athérosclérose, des risques de maladies artérielles, À quoi s'ajoute une diminution de la cicatrisation pouvant mener à des ulcères nécessitant parfois l'amputation.

Il a pu être mis à jour qu'une surexpression de HYAL1 en cas de diabète, participe à l'apparition de complications vasculaires suite à la dégradation du HA du glycocalyx endothélial. De plus, chez les patients diabétiques, on peut observer un état inflammatoire généralisé, provoqué par l'hyperglycémie, propice à l'apparition de ROS. Parmi les différentes cibles des ROS, on trouve également le glycocalyx endothélial qui est fortement altéré en cas de diabète.

En outre, chez les patients diabétiques (T1DM et T2DM) une augmentation de la concentration plasmatique en HA ainsi qu'une activité hyaluronidasique plasmatique plus élevée (HYAL1) ont été rapportées. Cette hausse de l'activité hyaluronidasique en combinaison avec les ROS sont responsables du shedding du HA et de la dégradation du glycocalyx (15,27, 28). En effet, la perte du HA au sein du glycocalyx diminue sa capacité de barrière de filtration et conduit au passage de macromolécules et protéines (dont la taille est inférieure à 70kDa) comme démontré chez des souris rendues diabétiques par utilisation de la streptozotocine (27). Cette altération du glycocalyx au niveau des glomérules rénaux induit la protéinurie. En outre la perte du HA au sein du glycocalyx provoque la formation d'œdèmes par la disruption des jonctions adhérentes et serrées entre les ECs.

Le cancer

Le cancer est au même titre que le diabète une pandémie touchant la population mondiale. En 2015, plus de 8.8 millions de personnes sont décédées des suites de cette maladie. Le cancer présente des facteurs de risque lié au mode de vie. Ainsi on peut dénombrer 5 facteurs de risque principaux que sont : une obésité prononcée, une faible consommation de fruits et légumes, un manque d'exercice physique, le tabagisme et la consommation d'alcool (29-30).

Le cancer est également une maladie génétique qui provoque la prolifération de cellules anormales qui envahissent les tissus sains environnants. La maladie commence à partir d'une mutation impactant le cycle réplcatif de la cellule. Il existe plusieurs mécanismes induisant la transformation de proto-oncogènes, gènes régulateurs du cycle cellulaire, en oncogènes qui vont promouvoir la prolifération de la cellule mutante.

- Une mutation au sein de la séquence ADN codante pour la protéine, la rendant beaucoup plus active que la protéine sauvage.

- Mutation régulatrice : une mutation au sein du promoteur de la protéine qui induit une surproduction de la protéine.
- Une amplification du proto-oncogène, qui induit une surproduction de la protéine
- Un réarrangement chromosomique : une séquence régulatrice proche peut impacter la synthèse du proto-oncogène, augmentant son expression par rapport à la production normale. Il peut y avoir durant le réarrangement une fusion de deux parties de chromosomes différents formant une nouvelle protéine hyperactive (chromosome de Philadelphie).

Cependant, la transformation en oncogène n'est pas suffisante pour qu'une cellule devienne cancéreuse. En effet, on a pu constater qu'il existe 6 modifications cellulaires qui permettent le départ de la formation de la tumeur. Parmi ces conditions on peut retrouver : 1) la transformation de proto-oncogènes en oncogènes, 2) la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeur ou la perte de la sensibilité des cellules aux signaux d'arrêt de croissance, 3) un échappement à l'apoptose, 4) la capacité de former des métastases, formation de tumeurs secondaires au sein de sites éloignées de la tumeur initiale, 5) une capacité de prolifération quasi infinie et 6) une capacité d'induire la production de vaisseaux sanguins pour irriguer la tumeur en croissance.

L'évolution d'un cancer se fait en plusieurs étapes. La première consiste en l'acquisition de plusieurs mutations génétiques prédisposant la cellule à pouvoir se multiplier sans limitation

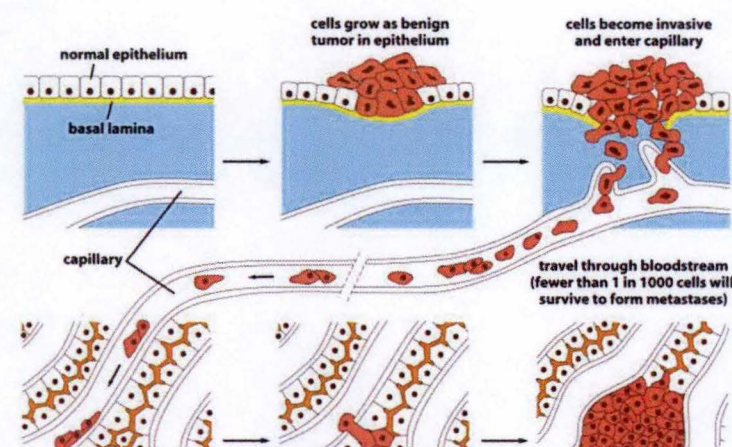


Figure 8 : Evolution d'une cellule tumorale. De la tumeur bénigne (quelques cellules en surface de l'endothélium) ; de la tumeur maligne (qui a rompu la lame basale et envahi le tissu) à la métastase (tumeur formée par des cellules tumorales s'étant déplacées, via les capillaires sanguins, vers un autre site). Figure 20-17, Molecular biology of the cell 5/e (© Garland Science 2008). Care, 2016)

et échapper à la mort cellulaire (Figure 8), (1-2). La cellule se multiplie alors sans contrôle et forme une tumeur bénigne qui colonisera le tissu localement où la cellule tumorale est née (Figure 8, 2). Ensuite, la tumeur peut développer des capacités invasives (métastase) en dégradant la MEC environnante afin d'atteindre les capillaires sanguins et gagner la circulation sanguine (Figure 8, 3-4). Certaines cellules coloniseront de sites plus éloignés pour reformer une tumeur, (Figure 8,5-6).

Aujourd'hui, la prévalence et l'incidence du cancer sont assez élevées, de sorte qu'un homme sur trois et une femme sur quatre sont susceptibles de déclarer un cancer. On distingue une multitude de formes de cancer touchant n'importe quel organe. Néanmoins 4 formes de cancers sont plus fréquentes (31) :

- Le cancer de la prostate, qui est la 2ème cause de décès par cancer chez l'homme. Ce cancer touche principalement les hommes âgés de 65 ans ou plus.

- Le cancer du sein, qui touche majoritairement la femme et qui peut toucher des femmes de tous âges.
- Le cancer du poumon, qui touche aussi bien les femmes que les hommes, bien qu'il semble y avoir une tendance indiquant que les hommes soient les plus touchés. Cette forme de cancer peut toucher des individus de tous âges.
- Le cancer colorectal (2ème cause de cancer chez la femme et 3ème chez l'homme).

Bien que le taux de mortalité diminue grâce aux nouveaux traitements et aux diagnostics, le cancer reste encore une cause majeure de mortalité à travers le monde.

La Hyal 1 et le HA dans le cadre du cancer

Une surexpression de HYAL1 est observée dans certaines formes de cancers, et corrèle avec le caractère agressif du cancer. (32). En effet, dans le cas de l'adénocarcinome (canalaire) pancréatique qui présente une augmentation de la synthèse de HYAL1 par les cellules cancéreuses, le turn over important du HA et la forte production de LMW-HA sont mis en relation avec une capacité accentuée de propagation et de migration des cellules. Une surexpression de HYAL1 est également présente dans le cancer du canal galactophore du sein et dans les ganglions métastasés ; les cellules cancéreuses surexprimant HYAL1 étant plus agressives que celles l'exprimant à un taux normal. De plus, les métastases dérivant de tumeurs surexprimant HYAL1 bénéficient de cette surexpression en ayant une meilleure capacité de liaison à la MEC, une prolifération augmentée et une meilleure aptitude à initier la néo-angiogenèse suite à la présence de fragments de LMW-HA (33-35).

L'amélioration de la capacité de liaison des métastases suite à la surexpression de l'HYAL1, se retrouve dans différents pronostics de cancers autres que le cancer du sein, tel que le carcinome pulmonaire de Lewis et l'adénocarcinome canalaire pancréatique. Cette amélioration, en partie due à HYAL1, est aussi liée au contexte inflammatoire qui apparaît aux sites de tumorigenèse : le taux de ROS plus élevé est propice à la formation de fragments de HA de faible poids moléculaire (LMW-HA) (34). En effet, la production élevée de LMW-HA active la synthèse de métalloprotéases MMP 9 et MMP 13 responsables de la dégradation du collagène interstitiel et la fibronectine au niveau de la MEC, ce qui favorise l'invasion des tissus sains par la tumeur.

Projet

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons voulu tester les capacités inhibitrices de différents inhibiteurs sur HYAL1 suite à son implication dans des maladies comme le cancer et le diabète. En effet, il apparaît que lorsque cette enzyme est absente ou incapable d'exercer sa fonction catalytique, les complications liées au diabète sont limitées (27). Chez des souris déficientes en HYAL1, on observe un glycocalyx endothélial mieux préservé en cas de diabète que celui des souris sauvages (WT). Cette préservation du glycocalyx induit une diminution des complications microvasculaires liées au diabète comme l'altération de la barrière de filtration des glomérules rénaux. L'inhibition d'HYAL1, dans ce cas, est donc proposée comme cible thérapeutique afin de limiter la dégradation du glycocalyx endothélial.

Dans le cadre du cancer, une diminution de l'activité, obtenue par utilisation de shARN ou par utilisation d'inhibiteur de HYAL1, l'hyaluromycine, permet de diminuer le caractère invasif des cellules tumorales (33). De plus la croissance des tumeurs est diminuée en présence de hyaluromycine qui diminue la production de LMW-HA, induisant une diminution de la prolifération cellulaire et une diminution de l'angiogenèse (33-36).

Dans le cadre de cette étude nous avons utilisé plusieurs inhibiteurs d'hyaluronidases dont certains sont connus et d'autres proposés comme inhibiteurs potentiels. Les inhibiteurs connus sont 1) l'acide glycyrrhizique (GA) qui est un dérivé de la réglisse possédant des vertus anti-inflammatoires. Il est connu pour être un inhibiteur puissant de la hyaluronidase testiculaire bovine (37) ; 2) l'acide L ascorbique 6 palmitate (Vc pal), qui est de la vitamine C sur lequel est greffée une chaîne palmitate (16 carbones) qui favorise la liaison de l'inhibiteur sur le site catalytique de l'enzyme (38) ; 3) l'héparine, puissant anticoagulant faisant partie de la famille des GAGs, constitué de N-acétylglucosamine et d'acides iduroniques. Elle est naturellement produite par l'organisme au sein des tissus conjonctifs, des poumons et également par les mastocytes durant la réponse immunitaire non spécifique. Cette molécule dispose également de capacités inhibitrices contre les hyaluronidases mais à des doses supérieures à celle utilisées dans le cadre d'un traitement antithrombotique (39-40).

Les inhibiteurs potentiels testés sont :

1) des dérivés du HA (13 kDa et de 350 kDa), sulfatés auxquels a été greffée une chaîne palmitate ont été obtenus grâce à la collaboration avec la firme pharmaceutique (Contipro, République Tchèque). Le HA-sulfaté imiterait le substrat en empêchant l'enzyme d'agir grâce à la sulfatation

2) des hexamères de HA également sulfatés auxquels ont été greffées soit une chaîne palmitate (16 carbones) soit une chaîne béhénate (22 carbones). Ces inhibiteurs pourraient se montrer intéressants car des GAGs de faible poids sulfatés (comme le verbascone, le planteose et la néomycine) ont déjà montré une certaine efficacité dans l'inhibition de la BHT (40).

3) l'hyaluromycine, fournie par le professeur Yasuhiro Igarashi, Toyama Prefectural University, Toyama, Japan ». Cette molécule a été purifiée à partir d'une espèce de

streptomycète marin connu pour son effet antitumoral en limitant la production de LMW-HA (41). Elle a récemment montré des effets intéressants dans le cadre de la lutte contre les cancers agressifs en limitant la production de LMW-HA (33).

Ces différents inhibiteurs ont été testés au travers de trois méthodes de mesure de l'activité hyaluronidasique : 1) le test de Reissig, (42) une ancienne technique de quantification indirecte de l'activité hyaluronidasique (1955) qui s'avère efficace et reproductible et est toujours utilisée actuellement (43-45).

2) les zymographies (forme dénaturante et native) offrant une vision qualitative et quantitative de l'inhibition de HYAL1 1 (46), et la zymographie inverse (47).

3) L'électrophorèse sur gel d'acrylamide permettant de visualiser les bandes d'oligosaccharides de HA résultant de sa dégradation (48).

Matériel et méthode

Hyaluronidase 1 humaine recombinante

La hyaluronidase1 recombinante humaine (rhuHYAL1) a été obtenue via la société Halozyme (San Diego, Californie, USA).

Culture cellulaire et lysat

Pour pouvoir analyser les inhibiteurs dans un contexte cellulaire complet, nous avons choisi d'utiliser des cellules de la lignée T47D qui synthétisent HYAL1 en quantité suffisante pour détecter son activité. Les cellules T47D sont des cellules épithéliales provenant d'une tumeur issue d'un cancer du sein. Ces cellules sont cultivées dans un milieu RPMI contenant 10% de FBS inactivé et 1% de pénicilline/streptavidine.

Les cellules sont ensemencées en plaque 6 puits à raison de de 400.000 cellules par puits (n = 4 puits) et cultivées jusqu'à confluence avant d'être lysées. Afin d'éliminer les traces du milieu de culture, les puits sont lavés deux fois dans 1ml de PBS froid, puis les cellules sont récupérées dans 500 µl de PBS froid au moyen d'un racloir. Les cellules des quatre puits sont ensuite poolées pour être centrifugées 3 minutes à 273,3 x g. Et le culot resuspendu dans 300 µl de tampon de lyse (Sucrose imidazole 10 mM complémenté par un cocktail d'inhibiteur de protéase (4%) : Protease Inhibitor Cocktail, PIC). Le tampon de lyse contenant les cellules sont ensuite lysées de façon mécanique par passage au Dounce (12 fois) avant d'être soniquées pendant 5 secondes. L'homogénat obtenu est conservé à -20°C.

Table 1 : Tableau récapitulatif du protocole de lyse cellulaire

Lavage	2 fois dans PBS froid
Grattage	Dans 500 µl PBS froid
Tampon lyse	Sucrose imidazole 10 mM
	PIC 4%
Lyse chimique	Dans 300 µl tampon lyse
Lyse mécanique	12 passages au Dounce
	5 secondes au sonicateur
Stockage	A -20 °C

Test de Reissig

La technique de Reissig est une réaction classiquement utilisée pour mesurer l'activité hyaluronidasique., La réaction est réalisée dans un volume de 130 µl en mettant l'enzyme avec 50 µl de HA (5mg/ml) ; 13 µl de tampon formate 1M pH 3,7 ; 8,6 µl de NaCl (1,5M) et le volume d'eau nécessaire pour atteindre le volume final. Les échantillons sont incubés overnight à 37°C afin de permettre l'activité enzymatique. Les échantillons sont ensuite placés dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes (avec le couvercle du tube percé pour éviter l'augmentation de pression), puis refroidis pendant 3 minutes à température ambiante. Afin de fixer la réaction, 30 µl d'acide borique 0,8M pH 10) fraîchement préparé sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite remis dans l'eau bouillante pendant 5 minutes.

750 µl de p-diméthylaminobenzaldehyde, (DMAB) (1,67% dans une solution HCl 2.08% ; acide acétique glacial 97,92%) sont ajoutés pour colorer la réaction. Les échantillons sont incubés 20 minutes à 37°C et centrifugés 5 minutes à 15.000xg. Le surnageant est récupéré pour lecture de l'absorbance à 585 nm (41). L'activité enzymatique est déterminée en calculant le pourcentage d'augmentation de l'absorbance par rapport à un blanc ne contenant pas l'enzyme.

Table 2 : Tableau récapitulatif du protocole du test de Reissig

Mix Reissig	50 µl HA 5 mg/ml
	13 µl tampon formate 1M pH 3,7
	8,6 µl NaCl 1,5 M
Mix réactionnel	Mix R + enzyme et eau pour volume finale de 130 µl
Incubation n°1	A 37°C overnight
Incubation n°2	5 min dans eau à 100°C puis repos à température ambiante pour 3 min
Fixation réaction	Ajout de 30 µl d'acide borique (0,8 M pH 10)
Incubation n°3	5 min dans eau à 100°C puis repos à température ambiante pour 3 min
Coloration au DMAB	Ajout 750 µl solution DMAB (1,67% dans HCl 2,08% et 91,2% acide acétique)
Incubation n°4	20 min à 37°C
Centrifugation	5 min à 15000 g
Lecture absorbance	A 585 nm

Zymographie renaturante

L'activité hyaluronidasique a également été testée par zymographie renaturante. Dans la zymographie renaturante, les échantillons sont chargés sur un gel d'acrylamide 10% (10x6cm) contenant 1mg/ml de HA (Sigma HA crête de coq). Une électrophorèse dans un tampon de migration (Tris 25 mM, Glycine 0.19M contenant du SDS) est réalisée sur glace pour éviter toute altération de l'enzyme pendant la migration. Suite à la présence de SDS, l'enzyme est dénaturé. Les gels sont ensuite incubés deux heures dans une solution de Triton X-100 3% pour permettre la renaturation de HYAL1 et incubés overnight à 37°C, sous agitation, dans un tampon formate 0,1M, NaCl 0,1M pH 3,7 afin de permettre la dégradation du HA contenu dans le gel par l'enzyme., Ensuite, le gel traité dans une solution de pronase (0,1 mg/ml), Tris/HCl 20 mM pH 8,8 pendant 2 heures, à 37°C afin de digérer les protéines contenues dans le gel. Le gel est ensuite lavé 30 minutes dans une solution formamide 50% puis coloré dans une solution Stainsall 15 %, formamide 35%) pendant une nuit dans le noir. Les zones où le HA est dégradé sont visibles après décoloration du gel dans l'eau. Le gel est photographié sur un banc trans-lumineux (45).

Table 3 : Tableau récapitulatif du protocole de zymographie renaturante

Echantillons	Bleu 5x + SDS (dilué 5 fois par volume final + eau)
Gel	10% acrylamide contenant 1mg/ml HA
Migration	Dans tampon migration (Tris 25 mM, Glycine 0,19M +SDS) sur glace
Renaturation	Dans Triton X-100 3% pendant 2 heures
Incubation	Dans tampon formate (0,1 M pH 3,7 ; NaCl 0,1 M) overnight à 37°C
Digestion protéines	Dans solution Tris 20 mM pH 8,8, pronase 0,1 mg/ml pendant 2 heures à 37°C
Lavage	30 min dans formamide 50%
Coloration	Dans Stainsall (Stainsall 15%, formamide 35%) overnight

Zymographie native

La zymographie en condition native se réalise suivant les mêmes étapes qu'en condition renaturante mais, dans ce cas, le SDS est absent du tampon de migration et du tampon de charge de sorte que l'enzyme reste dans sa conformation native. L'étape de renaturation dans le TritonX-100 n'est donc pas réalisée (45).

Tableau 4 : Tableau récapitulatif du protocole de zymographie en condition native

Echantillons	Bleu 5x (dilué 5 fois par volume final + eau)
Gel	10% acrylamide contenant 1mg/ml HA
Migration	Dans tampon migration (Tris 25 mM, Glycine 0,19M) sur glace
Incubation	Dans tampon formate (0,1 M pH 3,7 ; NaCl 0,1 M) overnight à 37°C
Digestion protéines	Dans solution Tris 20 mM pH 8,8, pronase 0,1 mg/ml pendant 2 heures à 37°C
Lavage	30 min dans formamide 50%
Coloration	Dans Stainsall (Stainsall 15%, formamide 35%) overnight

Zymographie inverse

Des zymographies inverses ont également été testées. Une première technique consiste à faire migrer l'inhibiteur d'intérêt dans le gel d'acrylamide contenant du HA, en condition native, l'enzyme (rhuHyal1 0,5 µl/ml) est ajouté lors de l'incubation dans le tampon formate. La suite du protocole comporte les mêmes étapes que la zymographie native classique. Un second type de zymographie inverse consiste en l'incubation d'un morceau de gel d'acrylamide contenant du HA (2x2cm) avec l'enzyme et l'inhibiteur d'intérêt dans le tampon formate adéquat pour l'activité enzymatique. Lors de cette zymographie aucune électrophorèse

n'est réalisée et la coloration du morceau de gel suis les mêmes étapes que lors de la zymographie native classique ; c-à-d Stainsall 15 %, formamide 35%, overnight dans l'obscurité (46).

Table 5 : Tableau récapitulatif des protocoles de zymographie inverses

	Zymographie inverse	Zymographie inverse 2
Echantillons	Bleu 5x (dilué 5 fois par vol finale) + enzyme + eau	Non nécessaire
Gel	10% acrylamide + HA (1mg/ml)	10% acrylamide + HA (1mg/ml) coupé en morceaux de 2x2 cm
Migration	Dans tampon migration (Tris 25 mM, Glycine 0,19 M) sur glace	Non nécessaire
Incubation	Dans tampon formate (0,1 M pH 3,7 ; NaCl 0,1 M) + 4,1 µg/ml de r hu Hyal1 overnight à 37°C	Dans tampon formate (0,1 M pH 3,7 ; NaCl 0,1 M) + 4,1 µg/ml de r hu Hyal1 + inhibiteur overnight à 37°C
Digestion protéine	Dans solution Tris 20 mM pH 8,8, pronase 0,1 mg/ml pendant 2 heures à 37°C	
Lavage	30 min dans formamide 50%	
Coloration	Dans Stainsall (Stainsall 15%, formamide 35%) overnight	

Migration de fragment de HA après digestion par la hyaluronidase

L'activité hyaluronidasique peut aussi être observée au travers des fragments de HA de différentes tailles générés lors de la dégradation enzymatique. On prépare un gel d'acrylamide à 15% contenant 56,9% de tampon borate (Tris 0,1M ; Borate 0,1M et 1,27 mM EDTA). La réaction enzymatique est réalisée dans un mix de 125 µl de HA dilué dans du tampon formate (0,1M pH=3,7 et NaCl 0,1M) pour la rhuHYAL 1 et dans du tampon acétate (0,1 M pH=3,9 et NaCl 0,1M) et de 25 µl contenant l'enzyme, la rhuHYAL1 ou 1 µl de BTH (5u /µl) avec ou sans la présence de l'inhibiteur. La réaction est incubée à 37°C pendant plusieurs heures pour la rhuHYAL1 et 2 heures pour la BTH. Lorsque l'incubation est terminée, on ajoute 30 µl de sucrose 2M dilué dans le tampon borate. 5 µl du mix réactionnel sont chargés sur le gel et l'électrophorèse est réalisé en chambre froide sur glace à 250 volts (20min), 480 volts (10 min) et 450 volts (15 min). Le gel est ensuite coloré dans de l'Alcian blue 0,05% dilué dans de l'eau acétifié à 1% pendant 30 minutes dans l'obscurité et décoloré dans de l'eau pendant 30 minutes. Le gel est alors plongé 30 minutes dans la solution de fixation (30% éthanol, 0.27 M sodium acétate, glutaraldehyde 1.3 mM, 3.16 mM Na2S2O3).

Le gel est lavé 3 fois pendant 5 minutes dans de l'eau puis est coloré dans la solution d'argent (1.47 mM AgNO₃, 0.125% formaldéhyde) pendant 40 minutes, les bandes d'oligosaccharides sont révélées via la solution de développement (NaCO₃ 0,23M ; 0.06%formaldéhyde) en deux fois.

La réaction est bloquée via une solution d'EDTA (1.46%) pendant 2 fois 5 à 10 minutes puis le gel est lavé 3 fois dans l'eau pendant 5 minutes pour être finalement stocké dans du glycérol ou séché (47).

Table 6 : Tableau récapitulatif du protocole de migration de fragment d'hyaluronan après digestion par la hyaluronidase

	rhuHyal	BTH
Mix HA	1,5 mg/ml HA dans tampon formate (pH 3,7 0,1M ; NaCl 0,1 M)	1,5 mg/ml HA dans tampon acétate (pH 3,9 0,1 M : NaCl 0,1 M)
Echantillon	125 µl mix HA + enzyme + eau pour volume final de 150 µl	125 µl de mix HA + enzyme (5U) + eau pour volume final de 150 µl
Incubation	1-16 heures à 37°C	2 heures à 37°C
Tampon borate	Tris 0,1M ; Borate 0,1M et 1,27 mM EDTA	
Gel	Acrylamide 15% ; 56,9% tampon borate	
Solution sucrose	Sucrose 2M dans tampon borate	
Finalisation échantillon	Ajout 30 µl solution sucrose dans l'échantillon	
Charge dans gel	5 µl échantillon + 1 piste avec 10 µl bleu bromophénol (suivi migration)	
Migration	Sur glace en chambre froide en 3 phases :	
	1) A 250 volts durant 20 min	
	2) A 480 volts durant 10 min	
	3) A 450 volts durant 15 min	
Coloration n°1	Dans solution Alcian blue {0,05% dans eau acétifiée (1%)} durant 30 min dans le noir	
Lavage n°1	30 min dans de l'eau	
Fixation	30 min dans solution fixation (30% éthanol ; 0,27 M acétate de sodium : 1,3 mM glutaraldéhyde ; 3,16 mM thiosulfate de sodium)	
Lavage n°2	3 fois 5 min dans eau	
Coloration n°2	40 min dans solution d'argent (1,47 mM nitrate d'argent ; 0,125% formaldéhyde)	
Développement	En 2 fois avec solution développement (0,23 M carbonate de sodium ; 0,06% formadehyde)	
Arrêt de la réaction	2 fois 5 à 10 min dans solution EDTA (1,46%)	
Lavage n°3	3 fois 5 minutes dans eau	
Conservation	Dans glycérol 10% ou sécher le gel	

Analyse statistique

Les résultats obtenus via le test de Reissig ont été analysés statistiquement par le programme Graph Pad prism sous la modalité : régression non linéaire, log inhibiteur vs réponse normalisée, afin de déterminer l'IC50 et le R^2 correspondant.

Les différents signaux d'activité obtenus en zymographie (native et renaturante) ont été quantifiés via le programme ImageJ (aire, pixel). Les résultats ont été analysés par le programme Graph Pad prism sous la modalité : régression non linéaire, log inhibiteur vs réponse normalisée, afin de déterminer l'IC50 et le R^2 correspondant.

Résultats

Mise au point du test de Reissig pour mesure l'activité de l'Hyal1

Afin d'analyser les capacités inhibitrices des molécules d'intérêt, les conditions d'expérimentation du test de Reissig ont été validées par différentes mesures d'activité hyaluronidasique. (Figure 9). La méthode de Reissig permet de mesurer la dégradation du HA grâce à une réaction colorimétrique entre la N acétyl-glucosamine et le DMAB. Tout d'abord, l'activité hyaluronidasique a été mesurée dans le sérum de souris WT (celle-ci étant due à HYAL1), l'absence d'activité dans le sérum de souris Hyal1^{-/-} (KO) a également été vérifiée. 1, 5 et 10 µl sérum WT montrent une réponse croissante de l'activité (Figure 9A). Par la suite, 5 µl du sérum WT ont été utilisés comme contrôle positif. Ensuite, nous avons mesuré l'activité de l'enzyme purifiée HYAL1 humaine recombinante (rhuHyal1) : 10, 100, 500 ng et 1 µg ont été testés sans succès. Afin d'obtenir un signal visible, la rhuHyal1 (5 et 10 ng) a été testée en présence de protéines provenant de la Fraction M (5, 10 ou 20 µg). La Fraction M (fraction enrichie en protéines mitochondriales et lysosomiales) a été préparée à partir de foie de rat, par centrifugation différentielle, a été suggérée pour augmenter l'activité de la rhuHyal1 (48). Une activité proche de celle obtenue pour 5 µl de sérum WT, est observé pour 10 ng de rhuHyal1 et 20 µg de Fraction M. C'est cette condition qui a été utilisée pour les études d'inhibiteurs dans la suite de ce travail. L'analyse de l'activité présente dans la fraction M seule, en comparaison au mix rhuHYAL1+ Fraction M montre une activité importante de fraction seule mais néanmoins inférieure à celle du mix (Figure 9C). L'activité observable via le test de Reissig et mesurée par la suite est donc vraisemblablement due à HYAL1 de rat présente dans les lysosomes de foie, mais sans doute également à la rhuHYAL1 boostée par la fraction M. Comme démontré par Marielle Boonen et son équipe : HYAL1 est responsable de 80% de l'activité hyaluronidasique détectée au sein de la fraction M du foie (48). Les zymographies réalisées dans la suite de ce travail nous permettront également de discuter l'activité due aux différentes formes de l'enzyme.

Nous avons également testé l'impact de différentes sources de protéines comme l'albumine où les protéines plasmatiques sur l'activité de la rHuHyal1 (10 ng) (Figure 9B). 20 µg de protéines sériques, provenant de souris KO Hyal1 hyal1^{-/-} ou 20 µg d'albumine (BSA) ont été ajoutés à la rhuHYAL1 ; aucun effet n'a pu être observé. La BSA ou les protéines sériques n'impactent donc pas l'activité de la rhuHYAL1 contrairement à d'autres études qui ont montrées une augmentation l'activité de HYAL1 humaine (provenant d'extrait tumoraux) en présence de BSA, de transferrine ou d'hyaluronectine -glycoprotéine pouvant lier le HA (49).

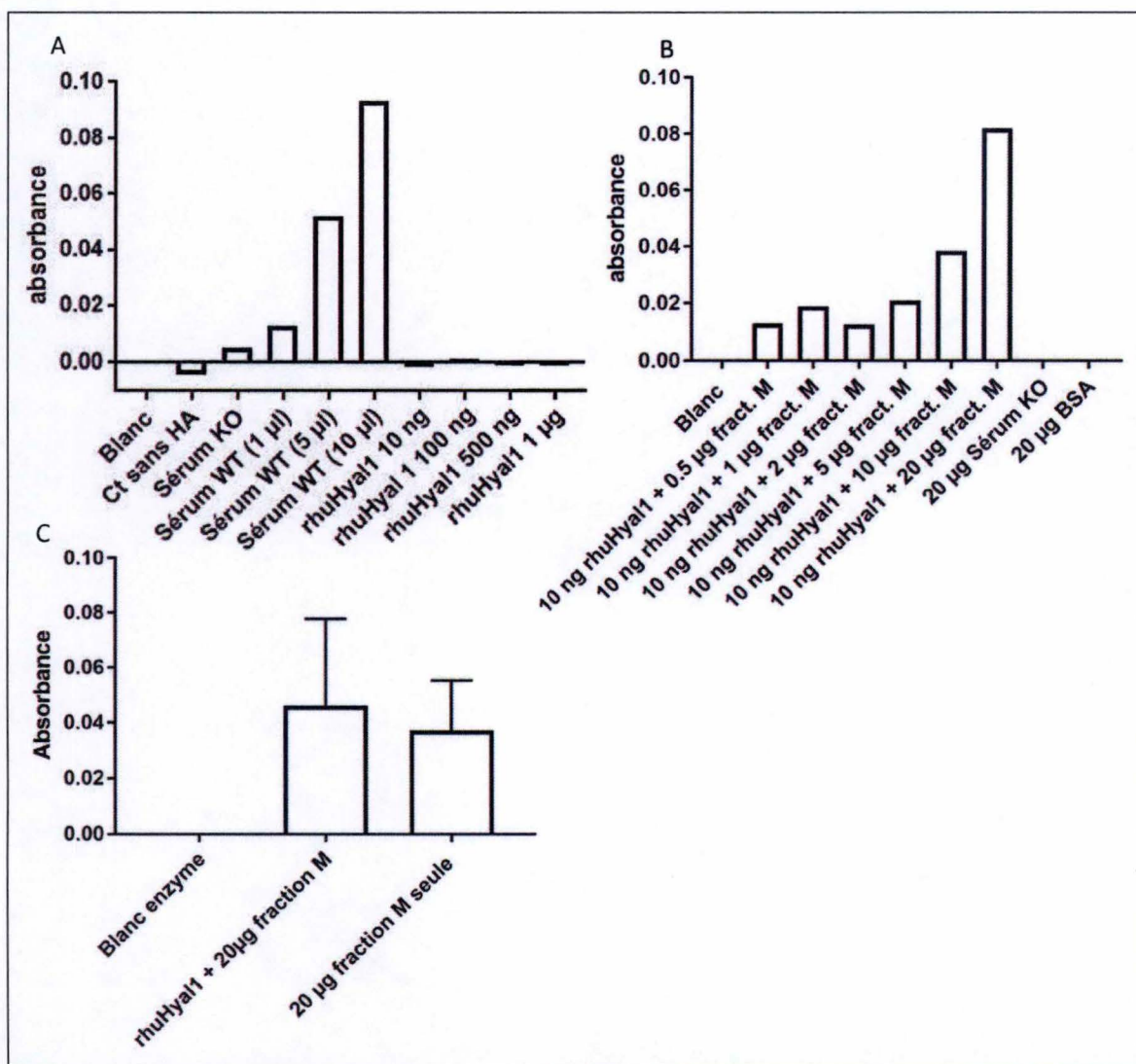


Figure 9 : Activité de HYAL1 mesurée par test de Reissig. A) Validation du test de Reissig sur sérum de souris WT et KO Hyal1. Mesure de l'activité de 10ng, 100 ng, 500 ng et 1µg de rhuHYAL1. B) Activité de la rhuHYAL1 en présence de 1µg, 2µg, 5µg, 10µg et 20µg de Fraction M, en présence de BSA, ou en présence de protéines de sérum de souris KO HYAL1. C) Comparaison de l'activité de rhuHYAL1 en présence de la fraction M et de l'activité de la fraction M seule, valeur moyenne (n=3).

Nos observations vont donc dans le sens d'un élément présent au sein de la fraction M qui augmente l'activité de la rhuHYAL1.

Inhibition de l'activité de HYAL1 par l'acide glycyrrhizique et l'acide L-ascorbique hexadécanoate via le test de Reissig

Sur base de l'activité de 10ng de rhuHyal1 et 20 µg de fraction M, nous avons testé l'effet d'un inhibiteur connu des hyaluronidases : l'acide glycyrrhizique (GA). Bien qu'il soit un inhibiteur efficace de HYAL1 produite par les cellules de drosophiles ($IC_{50} : 39,4 \mu M$) ou par *E. coli* (50), le GA n'est pas spécifique et peut inhiber également la BTH (Bovine testicular hyaluronidase) et la hyaluronate lyase (hyaluronidase bactérienne) (51).

Nos résultats révèlent un IC_{50} de $85 \mu M$ ($R^2 = 0.6204$) (Figure 10A), pour les conditions décrites précédemment (10 ng de rhuHyal1 + 20 µg de fraction M), L'inhibition a également

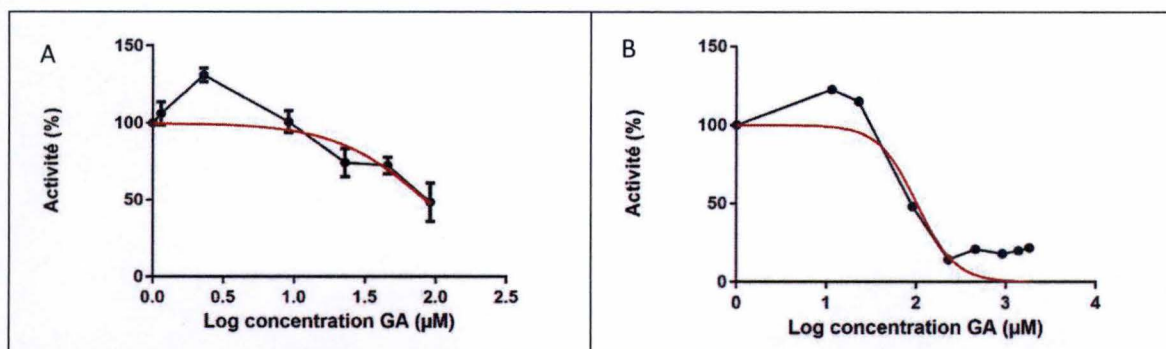


Figure 10 : Inhibition de HYAL1 par l'acide Glycyrrhizique (GA). Effet de doses croissantes de GA ((A) de 0.125 à 20 µg ; (B) de 1.25 à 200 µg) sur l'activité de HYAL1 par le test de Reissig. L'activité est exprimée en % d'activité basale pour (A) 10ng de rhyHYAL1+ 20 µg Fract M (n=3) et (B) 100 ng de rhuHYAL1+ 20 µg Fract M (n=1). Analyse statistique : régression non linéaire, log inhibiteur vs réponse normalisée (Graphpad Prism) : IC50 84,64 µM, R²=0,6204 ; IC50 102.4 µM, R² = 0,8577 pour A et B respectivement.

été testée sur 100 ng de rhuHYAL1 +20 µg de fraction M. (Figure 10B). Les résultats obtenus sont proches et confirment l'inhibition dose dépendante de l'enzyme par le GA : IC50 de 102 µM (R² = 0,8577).

Un dérivé de la vitamine C : l'acide L-ascorbique 6 hexadecanoate (Vc pal), a également été testé. Le Vc pal est un inhibiteur potentiel des hyaluronidases, grâce à l'ajout d'une chaîne palmitate (16 carbones) localisée sur le carbone 6 de la vitamine C. Cette molécule est capable d'inhiber l'activité hyaluronidasique de la BTH avec un IC50 de 56 µM (36). La présence d'une chaîne carbonée sur la molécule la rend insoluble dans l'eau ; mais bien soluble dans des milieux organiques tels que le diméthylsulfide (DMSO) ou l'éthanol (EtOH). L'impact des solvants organiques sur l'activité de HYAL1 a donc été testé (Figure 11A et B). Nous observons que lorsque la concentration en DMSO est au-delà de 1,5% dans le mix réactionnel du Reissig, l'activité enzymatique est altérée (Figure 11A). Les mêmes observations peuvent être faites pour l'EtOH (Figure 11B).

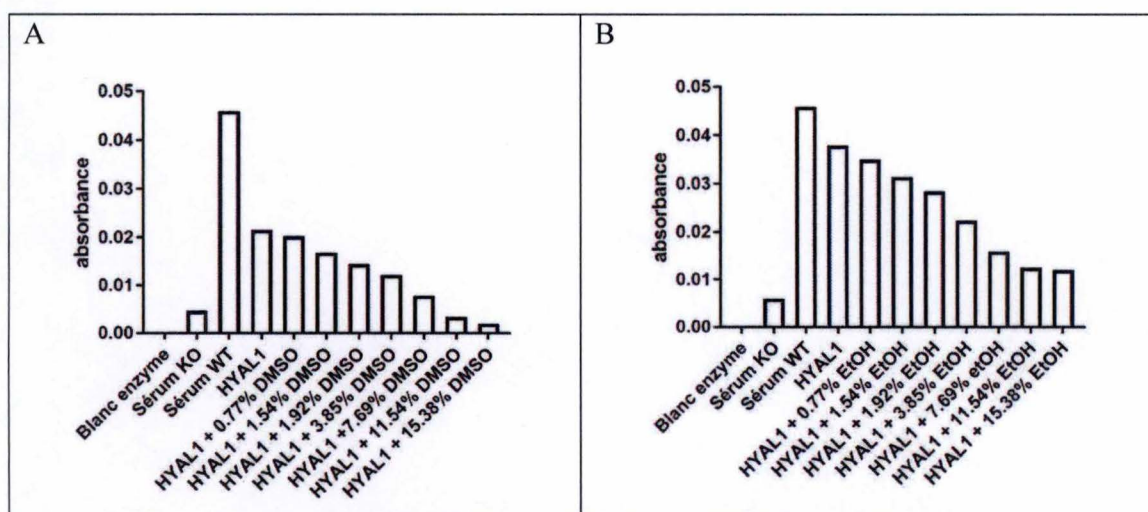


Figure 11 : Impact de solvants organiques sur l'activité hyaluronidasique mesurée par la méthode de Reissig. Mesure de l'activité HYAL1 en présence de concentrations croissantes de DMSO (A) et d'éthanol (B) (concentrations finales dans l'échantillon : de 0.77 à 15.38 %). A) Mesure de l'activité de HYAL1 seule ou en présence de 0.77%, 1.54%, 1.92%, 3.58%, 7.69%, 11.54% et de 15.38% de DMSO dans le mix réactionnel. B) Mesure de l'activité de HYAL1 seule ou en présence de 0.77%, 1.54%, 1.92%, 3.58%, 7.69%, 11.54% et de 15.38% d'éthanol dans le mix réactionnel.

Dès lors, nous avons adapté les dilutions de Vc pal afin de rester sous 1,5% de DMSO dans le volume final du mélange réactionnel. Nous avons choisi le DMSO comme solvant organique. Plusieurs concentrations de Vc pal ont été testées afin de mesurer sa capacité d'inhibition (de 1 à 50 μg , c'est-à-dire de 19, μM à 928 μM) (Figure 12), comme attendu nous observons que le Vc pal inhibe HYAL1 mais avec une efficacité moindre que le GA (IC_{50} : 791 μM , $R^2=0.5564$).

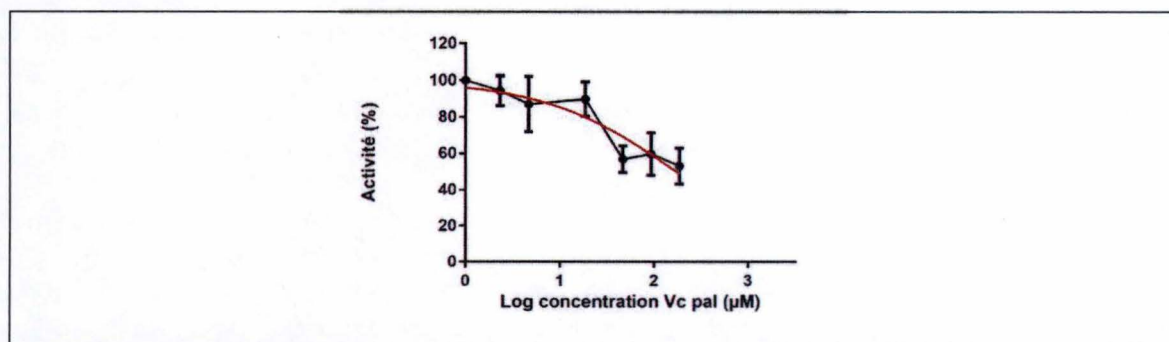


Figure 12 : Inhibition de l'activité de HYAL1 par l'acide L-ascorbique 6 palmitate (Vc pal). Effet de doses croissantes de Vc pal sur l'activité de HYAL1 par le test de Reissig. L'activité est exprimée en % d'activité basale pour 10 ng de rhuHYAL1+ 20 μg Fract M ($n=3$). Analyse statistique : régression non linéaire, log inhibiteur vs réponse normalisée (Graphpad Prism) : IC_{50} : 172,6 μM , R^2 : 0.5564.

Capacité inhibitrice d'oligosaccharides de HA sulfaté (13 et 350 kDa) et hexamères de HA sulfatés

L'inhibition de HYAL1 a ensuite été testée au moyen d'oligosaccharides de HA sulfatés. Nous disposons de quatre types de HA sulfaté : du HA de 13 et 350 kDa sur lesquels est greffée une chaîne palmitate (C16) et deux hexamères de HA auxquels ont été greffés une chaîne palmitate ou béhénate (C22). En effet, il a été montré que les oligosaccharides sulfatés ont un potentiel inhibiteur sur HYAL1 (38). Suite à la présence de cette chaîne carbonée nous avons testé la solubilité des différents types de HA dans de l'eau comme dans le cas de Vc pal et observé que malgré la présence de la chaîne carbonée, les HA-sulfaté greffés avec une chaîne carbonée sont solubles dans l'eau et très peu dans le DMSO (données non montrées). Ensuite, nous avons effectué un test Reissig (contrôle sans enzyme) sur ces deux oligosaccharides HA-S 13 (28.6 μM) et 350 kDa (1.1 μM) et sur les hexamères de HA-S C16 (123.5 μM) et C22 (105.1 μM) pour vérifier que ces inhibiteurs n'interfèrent pas avec la réaction suite à la présence d'hexosamines pouvant régir le DMAB, (Figure 13). Nous avons observé une interférence du HA-S C16 de 13 kDa et des deux formes d'hexamères de HA (et non du HA-S C16 de 350 kDa), en effet, l'absorbance lue en absence d'enzyme est similaire à celle du sérum WT. Seul le HA-S C16 350 kDa, a donc été testé par cette méthode. Un « range » de concentrations allant de 0,022 μM à 0,439 μM a été utilisé afin d'analyser l'inhibition de HYAL1 (Figure 14). L' IC_{50} calculé pour le HA-S 350 kDa est de 0,22 μM ($R^2=0.8993$).

Analyse de la capacité inhibitrice de l'héparine et la hyaluromycine

Enfin, nous avons testé l'héparine, un anticoagulant faisant partie de la famille des glycosaminoglycans (oligosaccharides) et connue pour perturber l'activité de HYAL1 de par sa structure similaire à celle du HA (37) et qui ne perturbe pas la lecture de l'absorbance

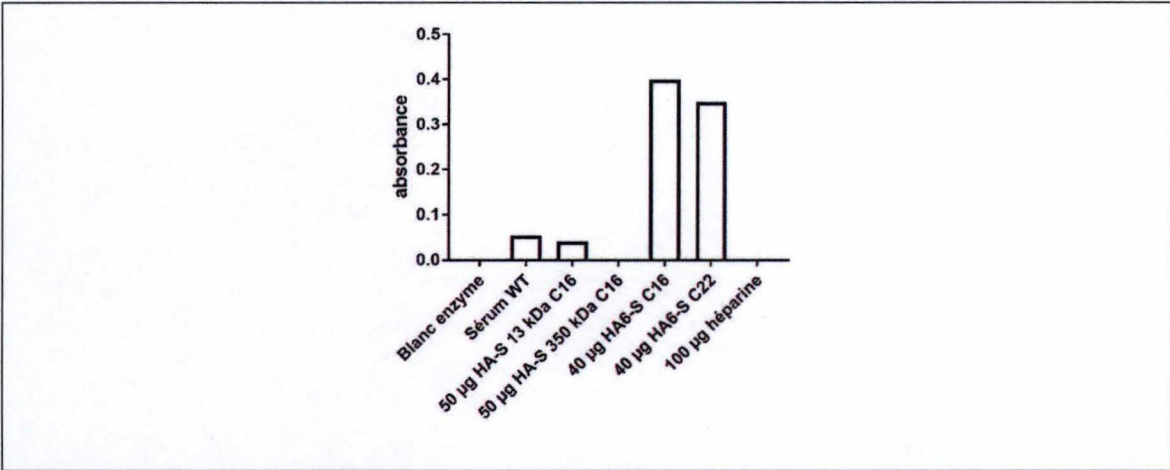


Figure 13 : Impact des inhibiteurs dérivés du HA et de l'héparine sur l'absorbance lue durant le test de Reissig. Mesure de l'absorbance du HA-S 13 kDa (28,6 µM), du HA-S 350 kDa (1.1 µM), de l'hexamère de HA-S palmitate (C16) (123, 5 µM), de l'hexamère de HA-S béhénate (C22) (105,1 µM) et de l'héparine (51,28 µM).

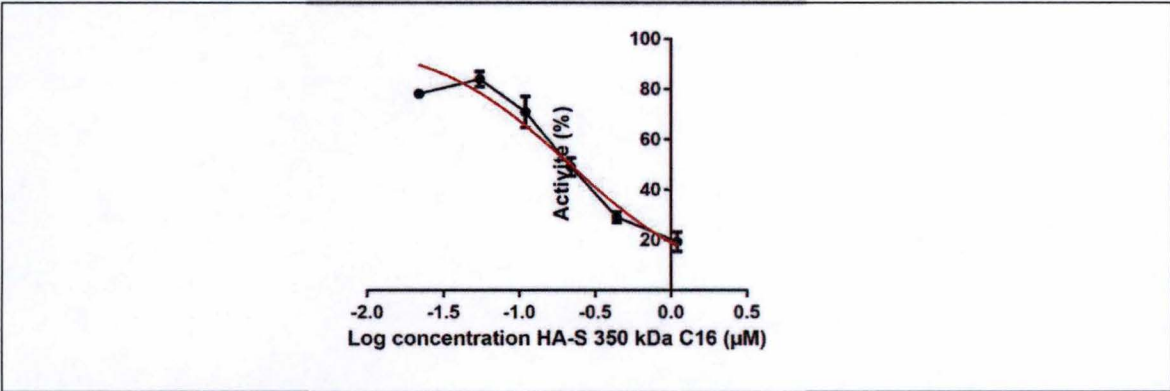


Figure 14 : Inhibition de l'activité HYAL1 par le HA-S 350 kDa C16. Effet de la dose croissante de HA-S 350 kDa sur l'activité de HYAL1 (n=3). Analyse statistique : régression non linéaire, log inhibiteur vs réponse normalisée : IC₅₀ : 0,2176 µM et R² : 0,8993

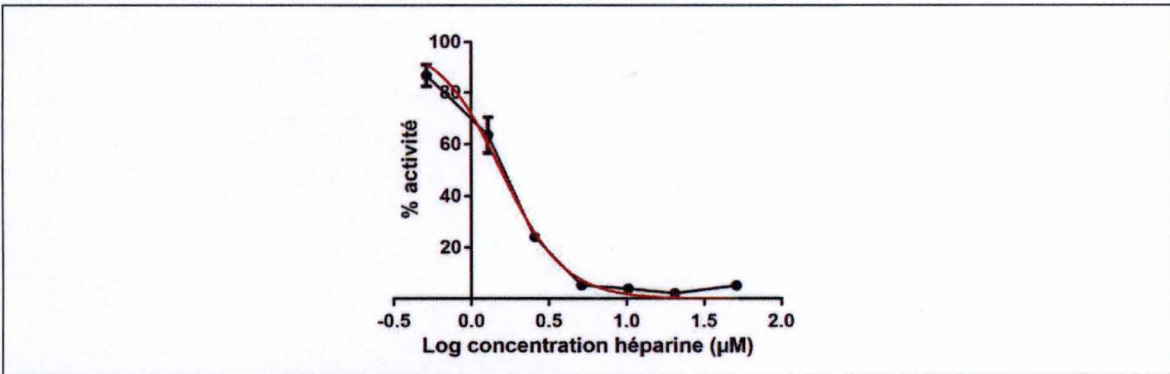


Figure 15 : Inhibition de l'activité de HYAL1 par l'héparine. Effet de doses croissantes d'héparine sur l'activité de HYAL1. L'activité est exprimée en % d'activité basale pour 10 ng de rhuHYAL1+ 20 µg Fract M (n=3). Analyse statistique : régression non linéaire, log inhibiteur vs réponse normalisée (Graphpad Prism) : IC₅₀ :1,559 µM et R² : 0,9698.

(Figure 13). La figure 15 montre une inhibition de HYAL1 par l'héparine un IC₅₀ de 1.6 µM (R²=0.9698) (Figure 15)

L'hyaluromycine inhibiteur récemment découvert et purifiée par le Dr Enjuero Harunari et produit par une bactérie marine, a également été testée. L'hyaluromycine n'est pas soluble dans l'eau, et a donc été solubilisée dans le DMSO en respectant le % de DMSO limite pour la

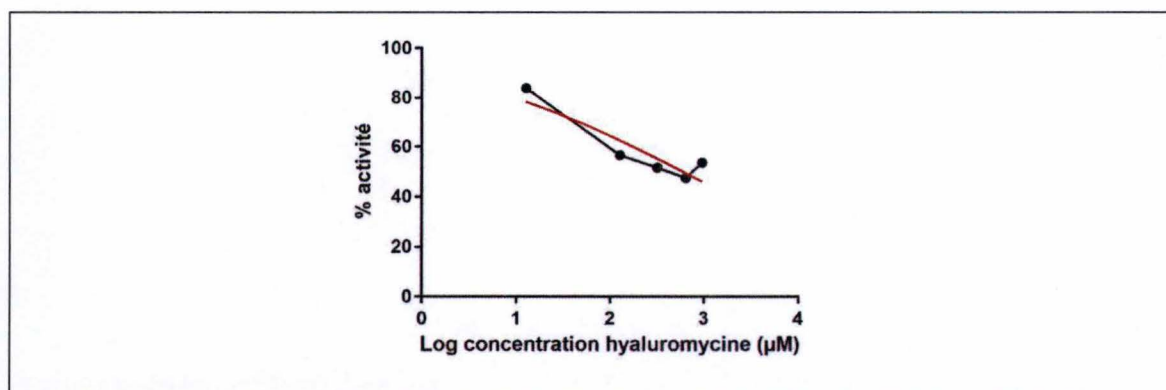


Figure 16 : Inhibition de l'activité de HYAL1 par l'hyaluromycine. Effet de doses croissantes d'hyaluromycine sur l'activité de HYAL1. L'activité est exprimée en % d'activité basale pour 10 ng de rhuHYAL1+ 20 µg Fract M (n=1). Analyse statistique : régression non linéaire, log inhibiteur vs réponse normalisée (Graphpad Prism) : IC50 :593,9 µM et R^2 : 0,8332

réaction (Figure 11). Des concentrations allant de 13 µM à 956 µM ont été testées et l'IC 50 calculé : 594 µM ; R^2 =0,8332 (Figure 16)

Analyse par zymographie de l'activité de la rhuHYAL11

Dans une deuxième approche, la technique de zymographie a été utilisée afin de confirmer les premiers résultats obtenus via le test de Reissig (Figure 17). Premièrement, 2 et 10 ng de l'enzyme recombinante ont été testés dans les conditions renaturantes. L'enzyme a été testé seul ou en présence de la fraction M (2µg). Les sérums de souris WT et de souris Hyal1^{-/-} ont été utilisés comme contrôles positif et négatif respectivement (Figure 17A). L'activité de HYAL1 n'est détectable qu'en la présence de la fraction M que ce soit en zymographie renaturante (Figure 17B) ou en zymographie native (Figure 17C). La zymographie native apporte les mêmes observations quant à la présence de la fraction M (Figure 17C). En zymographie renaturante (Figure 17A-B), le sérum de souris WT montre une bande aux alentours de 80 KDa cette bande correspond à la forme précurseur de l'enzyme, circulant dans le plasma. En WB cette forme migre à la taille 57 kDa. Pour le mix rhuHYAL1 + Fract M, deux bandes sont observées : une inférieure à 80 KDa qui pourrait être la forme précurseur de la rhuHYAL1 (légèrement plus petite que la forme murine, contrairement à la forme de rat) et une bande proche de 120 KDa. Cette bande pourrait être un agrégat, une dimérisation de l'enzyme. La nature de ce dimère n'est néanmoins pas connue et pourrait être formée par la rhuHYAL1 et/ou HYAL1 de rat., 2) De plus, il est possible que cette bande supérieure contiennent les formes précurseurs et clivées de l'enzyme. L'absence de signal dans la fraction M seule, confirme que la rhuHYAL1 est bien responsable de l'activité observée ,cependant son activité n'est visible que lorsqu'elle en présence de fraction M. Pour la suite des expériences, le mix suivant a été utilisé : 10 ng de la rhuHYAL1 et 2 µg de fraction M ; les zymographies ont été réalisées en condition native suite aux observations, chez la souris, d'une activité plus forte de la forme clivée en condition native qu'en condition renaturante.

Mesure de l'inhibition de l'activité de rhuHYAL1 par l'acide glycyrrhizique et l'acide ascorbique 6 palmitate en zymographie

L'inhibition de l'activité HYAL1 par le GA a été analysée par zymographie native ou renaturante. En se basant sur les premiers résultats obtenus en Reissig, différentes quantités de GA ont été testées (Figure 18). En condition renaturante (Figure 18A) ou en condition native

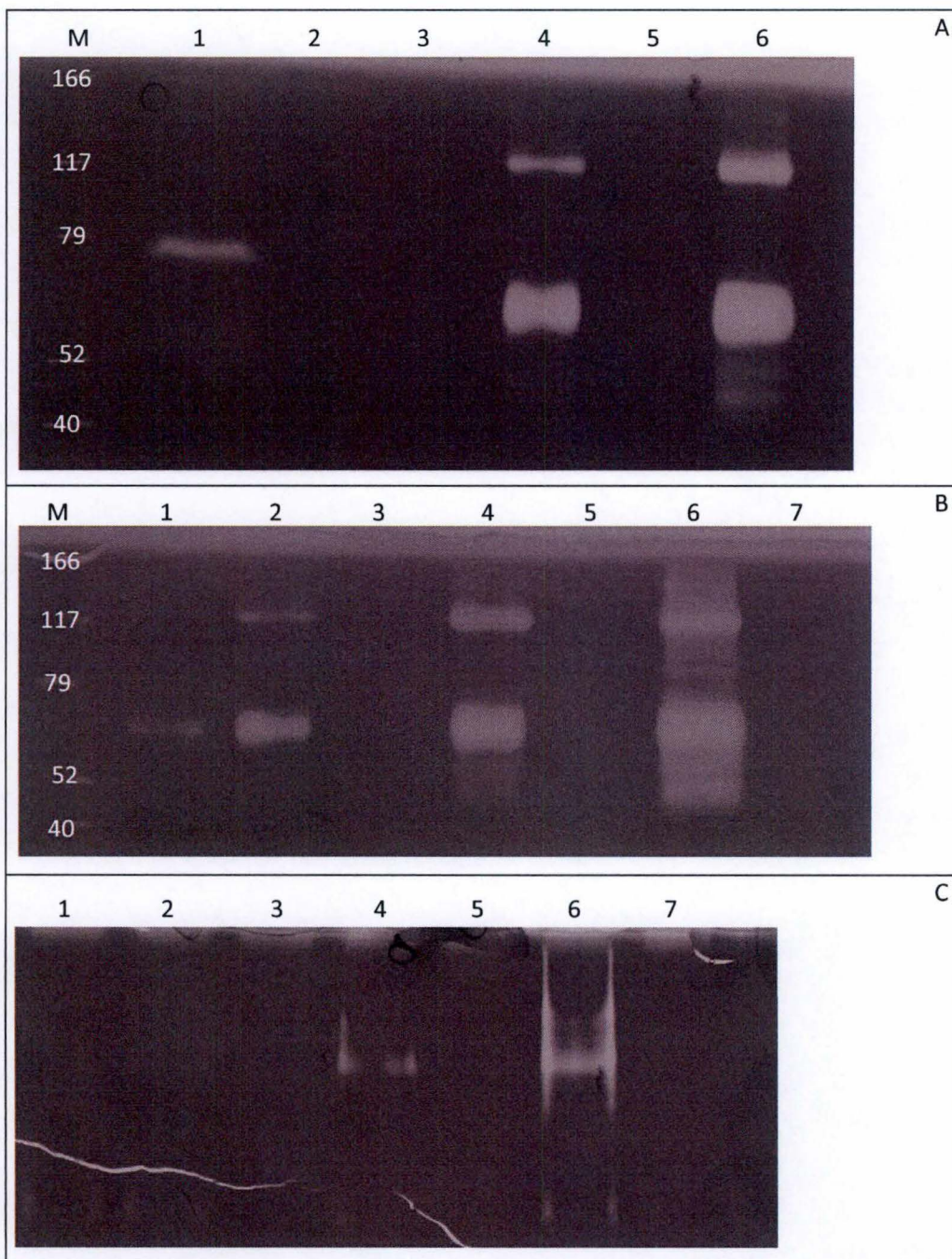


Figure 17 : Analyse de l'activité HYAL1 en zymographie en conditions renaturante (A-B) et native (C). A) Zymographie renaturante, rhuHYAL1 seule 2 ng (3) et 10 ng (5) ou en présence de 2 μ g de fraction M (4, 6), M : poids moléculaire (M), sérums de souris WT (1) et Hyal1^{-/-} (2), contrôles positif et négatif respectivement. B) Zymographie renaturante, rhuHYAL1 0.5 ng (1), 2 ng (2), 20 ng (4) et 100 ng (6) en présence (1, 2, 4, 6) ou en absence de 2 μ g de fraction M (3, 5) ; fraction M seule (2 μ g) (7). C) Zymographie native rhuHYAL1 0.5 ng (1), 2 ng (2), 20 ng (4) et 100 ng (6) en présence (1, 2, 4, 6) ou en absence de 2 μ g de fraction M (3, 5) ; fraction M seule (2 μ g) (7).

(Figure 18B) aucun effet de GA n'a pu être observé sur l'activité de HYAL1, même à la concentration de 92 μ M (10 μ g). Cette absence d'effet est peut-être due aux conditions de l'expérimentation (électrophorèse) qui seraient trop drastiques pour conserver l'interaction entre l'inhibiteur et l'enzyme.

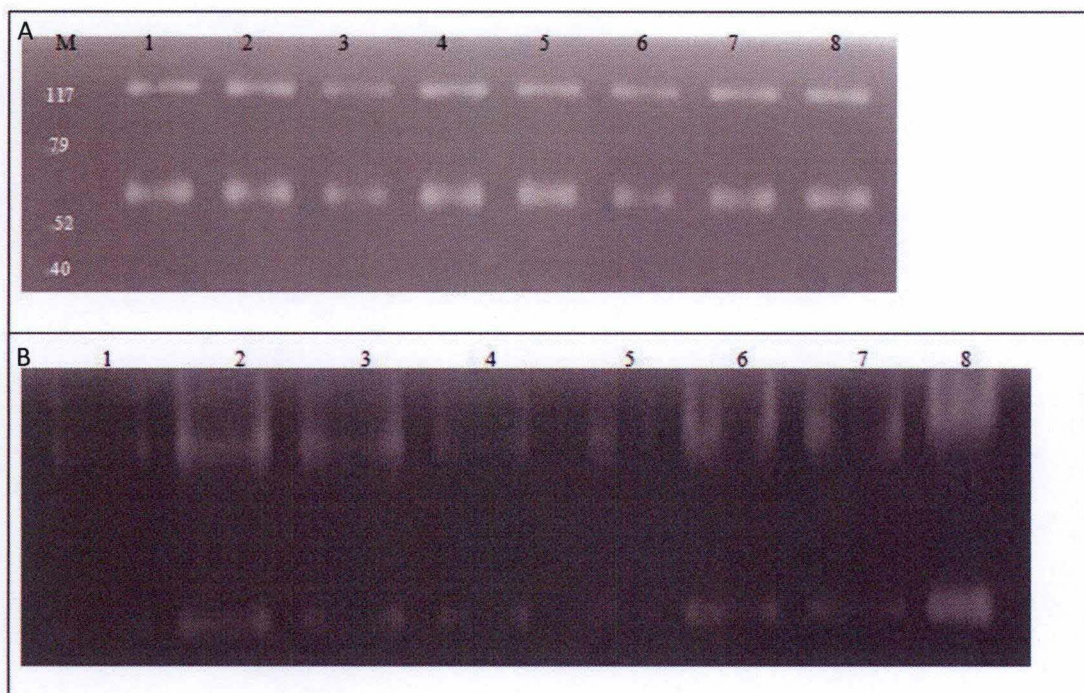


Figure 18 : Inhibition de l'activité HYAL1 par l'acide glycyrrhizique (GA) (n=3). A) Zymographie renaturante: rhu HYAL1 (10 ng) + fraction M (2 µg) sans inhibiteur (1) et avec 7.59 µM (2), 15.16 µM (3), 30.38 µM (4), 121.52 µM (5), 303, 79 µM (6), 607.58 µM (7) et 810.10 µM (8) de GA; marqueur de poids moléculaire (M):. B) Zymographie native : rhuHYAL1 (10 ng) + fraction M (2 µg) sans GA (1), et avec 7.59 µM (2), 15.16 µM (3), 30.38 µM (4), 121.52 µM (5), 303, 79 µM (6), 607.58 µM (7) et 810.10 µM (8) de GA

Avant de tester l'inhibition par le Vc pal, nous avons analysé l'impact de la quantité de DMSO sur l'activité de la rhuHYAL1 dans les conditions de la zymographie. On a pu prouver que tant que la quantité de DMSO ne dépasse pas les 2 µl, l'activité de la rhuHYAL1 n'est pas perturbée (Figure 19).

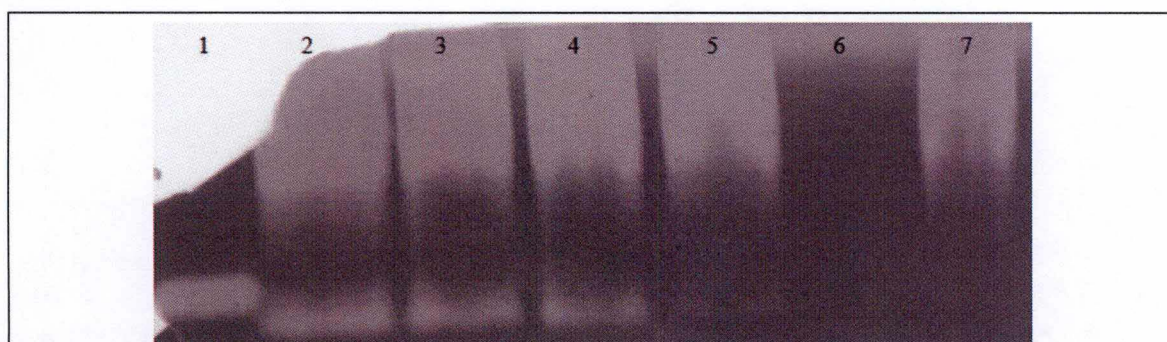


Figure 19 : Evaluation de l'impact du DMSO sur l'activité HYAL1 en zymographie native. Contrôle positif, sérum WT (5µl) (1) ; MIX HYAL1 (10 ng de la rhuHYAL1 et 2 µg de fraction M) (2) ; mix HYAL1+ 1 µl (3), 2 µl (4), 3µl (5), 4 µl (6) ou 5 µl de DMSO (7).

L'inhibition de l'activité HYAL1 par Vc pal a été analysée par zymographies en condition native (Figure 20). Différentes solutions de Vc pal solubilisées dans du DMSO ont été réalisées de sorte à utiliser 1 µl de solution d'inhibiteur pour chaque piste : 1µg, 2.5µg, 10µg, 20µg et 50µg de Vc pal par µl de DMSO (Figure 20A). La zymographie montre une inhibition de l'activité HYAL1 aux doses importantes de 10 µg à 50 µg de Vc pal soit de 0.19 à 0.93 mM. L'IC 50 calculé à partir de la quantification du signal de l'activité de la rhuHYAL1 par Image J est de 8.35 mM ($R^2 = 0.8673$) (Figure 20B).

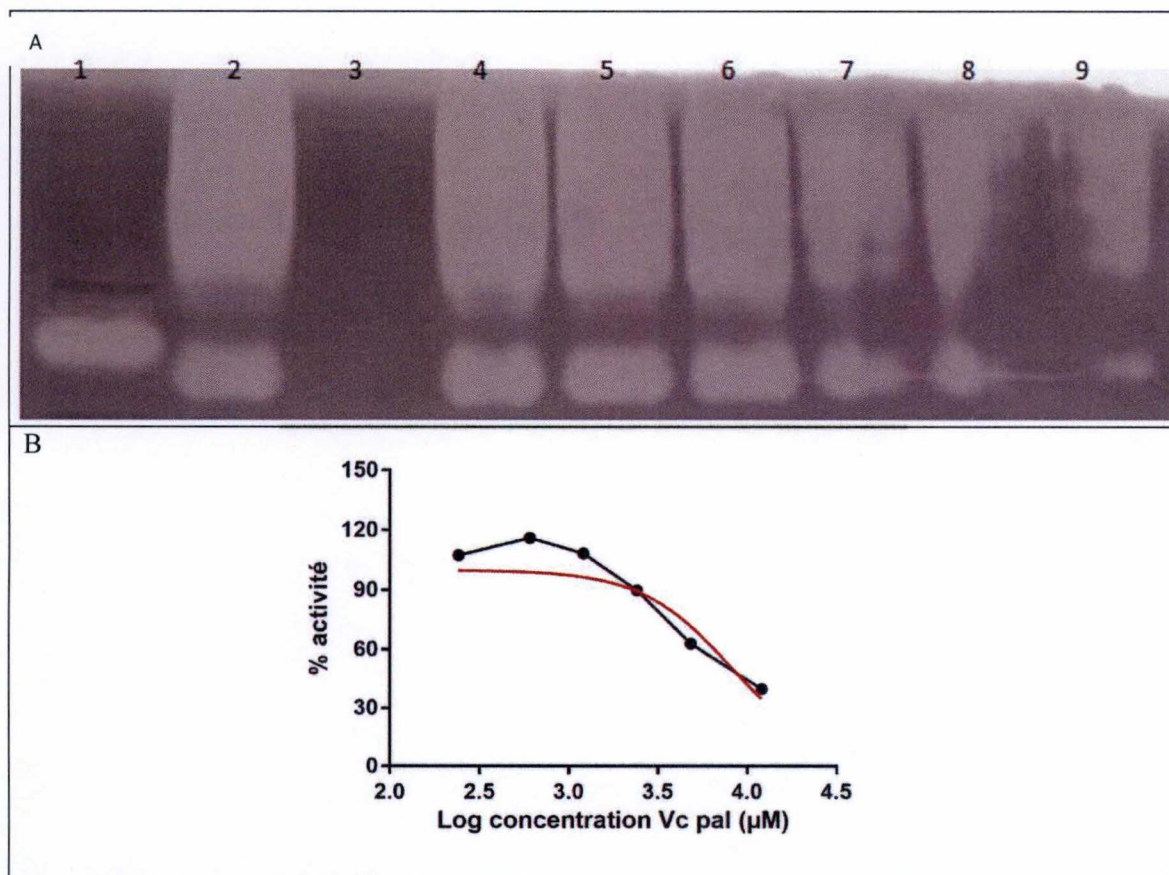


Figure 20 : Inhibition de l'activité HYAL1 par l'acide L ascorbique 6 palmitate (Vc pal). A) Zymographie native (n=1) : rhuHYAL1 (10 ng) + fraction M (2 µg) sans inhibiteur (2) et avec 0.24 mM (4), 0.60 mM (5), 1.21 mM (6), 2.41 mM (7), 4.82 mM (8), 12.06 mM (9) de Vc pal ; sérum de souris WT (1 µl) (1), Vc pal seul (12.06 mM) (3). B) Quantification de l'inhibition de la rhuHYAL1 par Image J ; activité exprimée en % de l'activité basale (n=1). Analyse statistique : régression non linéaire, log inhibiteur vs réponse normalisée (Graphpad) : IC50 = 8.349 mM ; R² = 0,8673.

Mesure de l'inhibition de l'activité HYAL1 par les HA-palmitate sulfatés (13 et 350 kDa) en zymographie

Nous avons ensuite testé la capacité inhibitrice des oligosaccharides de HA sulfatés auxquels une chaîne carbonée de 16 C a été greffée. Pour la HA de 13 kDa, les concentrations utilisées sont 7 µM, 19 µM, 37 µM, 74 µM, 149 µM et 186 µM. La figure 21 A, montre bien une diminution de l'activité proportionnelle à la quantité d'inhibiteur. À la concentration de 185,90 µM, on observe une inactivation totale de l'enzyme. L'IC50 calculé est de 81.32 µM (R² = 0.8414) (Figure 21B).

En ce qui concerne l'oligosaccharide de HA sulfaté de 350 kDa (Figure 22). Tout comme pour l'oligosaccharide de 13 kDa, on observe une diminution progressive proportionnelle de l'activité enzymatique. A partir de 3,80 µM, l'activité visible en zymographie est nulle (Figure 22A, piste 7). La quantification de cette activité par imageJ nous a permis de déterminer l'IC 50 de cet inhibiteur : 2.8 µM (R² = 0.5514) (Figure 22B).

Mesure de l'inhibition de l'activité HYAL1 par les hexamères de HA sulfatés en zymographie

La même approche a été réalisée pour tester le pouvoir inhibant de ces hexamères de HA sulfatés portant soit une chaîne palmitate (C16) soit behénate (C22). Pour HA6-S C16, les

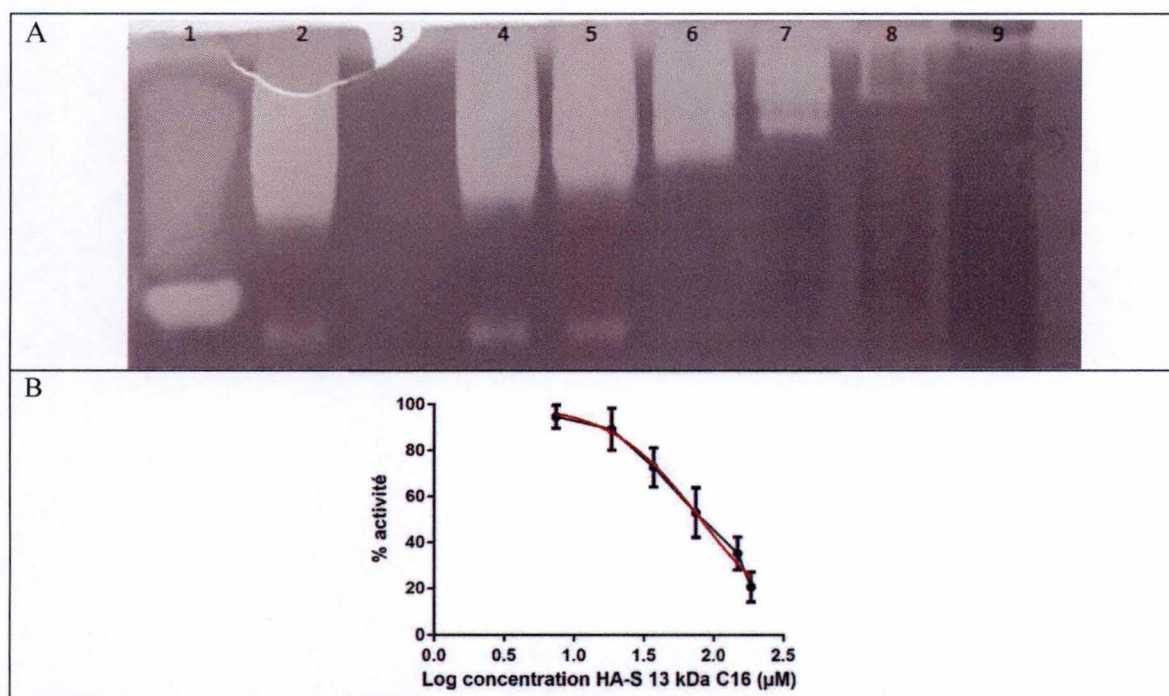


Figure 21 : Inhibition de l'activité HYAL1 par le HA-S 13 kDa C16. A) Zymographie native (n=3) : rhuHYAL1 (10 ng) + fraction M (2 µg) sans inhibiteur (2) et avec 7.43 µM (4), 18.6 µM (5), 37.17 µM (6), 74.35 µM (7), 148.71 µM (8), 185.9 µM (9) de HA-S 13 kDa C16 ; sérum de souris WT (1 µl) (1), HA-S 13 kDa seul (185.9 µM) (3). B) Quantification de l'inhibition de la rhuHYAL1 par ImageJ ; activité exprimée en % de l'activité basale (n=3). Analyse statistique : régression non linéaire, log inhibiteur vs réponse normalisée (Graphpad): IC50 = 51.32 µM ; R² = 0,8414.

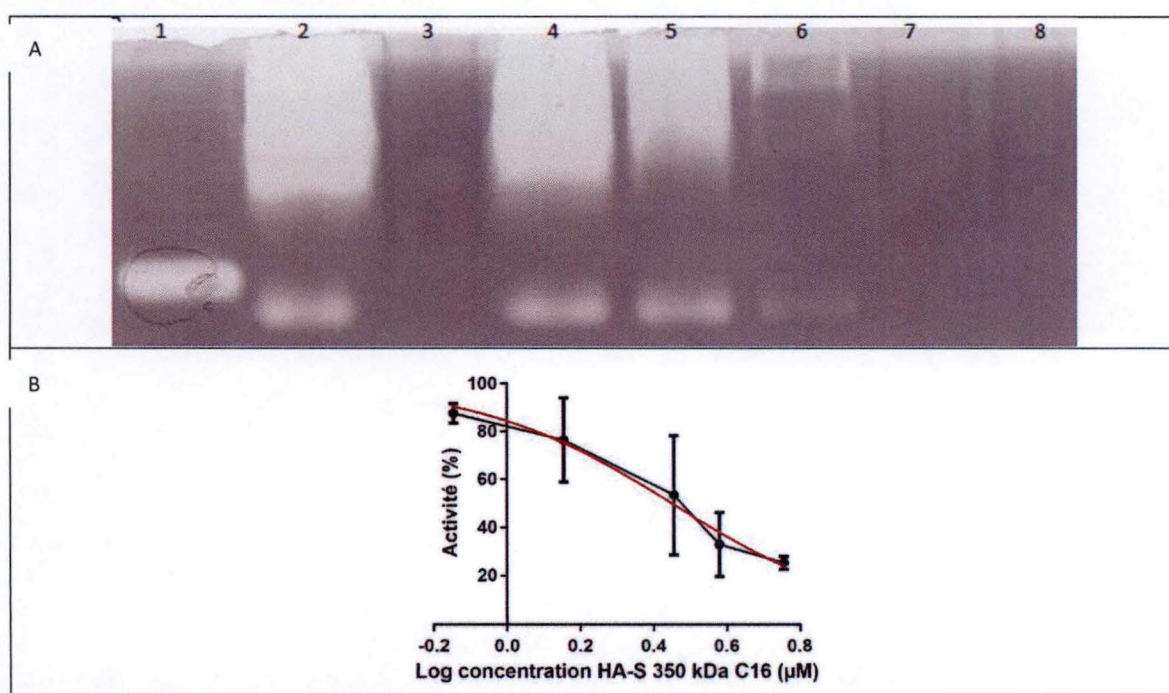


Figure 22 : Inhibition de l'activité HYAL1 par le HA-S 350 kDa C16. A) Zymographie native (n=3) : rhuHYAL1 (10 ng) + fraction M (2 µg) sans inhibiteur (2) et avec 0.713 µM (4), 1.42 µM (5), 2.85 µM (6), 3.80 µM (7), 5.71 µM (8) de HA-S 350 kDa C16 ; sérum de souris WT (1 µl) (1), HA-S 350 kDa seul (5.71 µM) (3). B) Quantification de l'inhibition de la rhuHYAL1 par ImageJ ; activité exprimée en % de l'activité basale (n=3). Analyse statistique : régression non linéaire, log inhibiteur vs réponse normalisée (Graphpad): IC50 = 2.827 µM ; R² = 0,514.

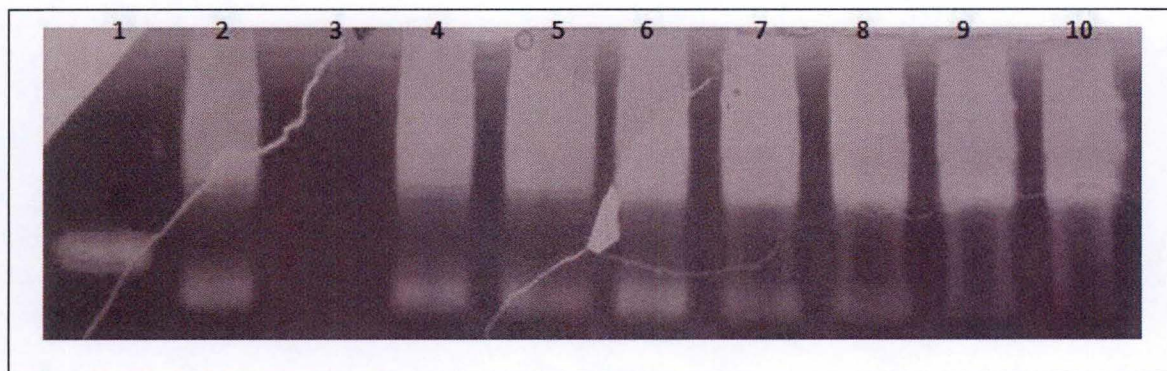


Figure 23 : Inhibition de l'activité HYAL1 par le HA6-S C16. Zymographie native (n=2) : 10 ng r hu Hyal1 + fraction M (2 µg), sans inhibiteur (2), avec 40.12 µM (4), 80.2 µM (5), 160.5 µM (6), 321 µM (7), 267.5 µM (8) 401.27 µM (9) et 577.8 µM (10) de HA6-S C16. Les pistes contrôles : sérum de souris WT (1) : 32µg de HA6 C16 sans enzyme (3) (n=2).

différentes concentrations utilisées : de 8 à 578 µM (Figure 23) n'ont pas montré de réel effet de cet hexamère un léger effet commence à être visible sur la bande du bas. Néanmoins, cet effet n'est pas suffisant pour pouvoir déterminer un réel effet de l'inhibiteur et des doses encore plus importantes devraient être testées.

Ensuite, nous avons testé l'hexamère de HA sulfaté greffé avec une chaîne béhénate (HA6 C22) (Figure 24A). Les différentes concentrations utilisées sont : de 68 µM, 137 µM, 228 µM, 273 µM, 341 µM et 492 µM. et montre une efficacité dès 137 µM (Figure 24A, piste 6). L'IC₅₀ calculée pour le HA6-S C22 est de 175.9 µM ($R^2 = 0.8756$) (Figure 24B).

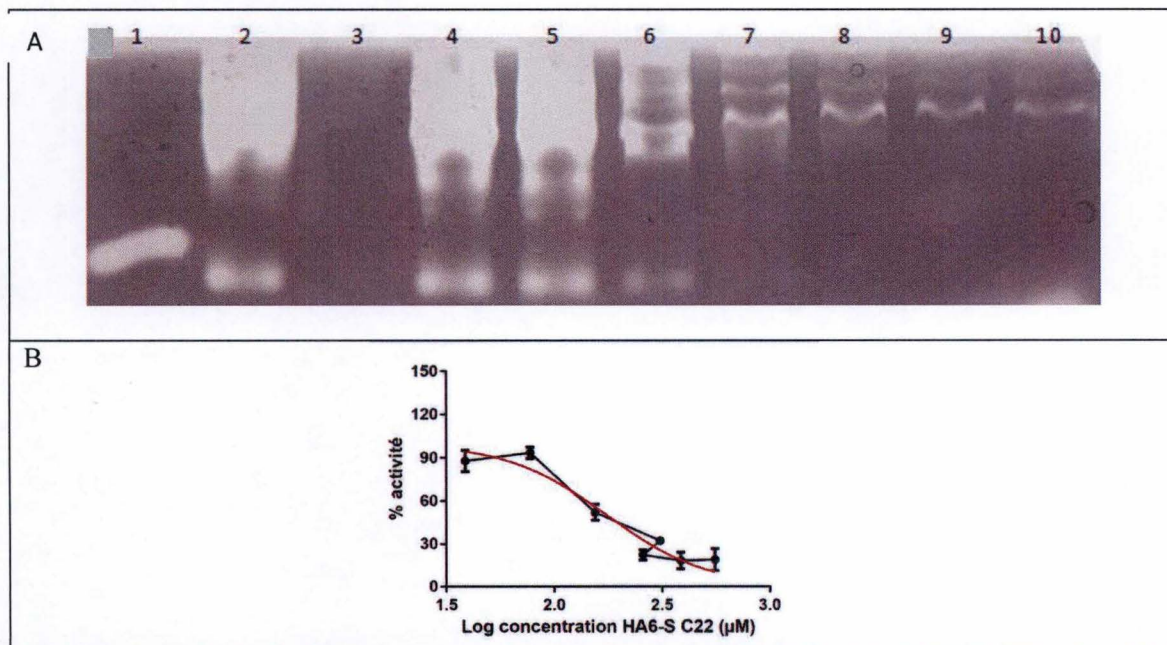


Figure 24 : Inhibition de l'activité HYAL1 par le H6A-S C22. A) Zymographie native (n=3) : rhuHYAL1 (10 ng) + fraction M (2 µg) sans inhibiteur (2) et avec 34.14 µM (4), 68.29 µM (5), 136.58 µM (6), 273.16 µM (7), 227.63 µM (8), 341.45 µM (9) et 437.05 µM (10) de HA6-S C22 ; sérum de souris WT (1 µl) (1), HA6-S C22 seul (437.05 µM) (3). B) Quantification de l'inhibition de la rhuHYAL1 par Image J ; activité exprimée en % de l'activité basale (n=3). Analyse statistique : régression non linéaire, log inhibiteur vs réponse normalisée (Graphpad) : IC₅₀ = 175.9 µM ; $R^2 = 0.8756$.

Mesure de l'inhibition de l'activité HYAL 1 par l'héparine en zymographie

Pour confirmer les capacités inhibitrices de l'héparine (Figure 25), nous avons utilisé des concentrations de 253 μM , 421 μM , 843 μM , 1685 μM , 2247 μM et 2696 μM . On peut observer une extinction du signal de la bande basse à partir de 843 μM (Figure 25A, piste 6). La quantification par imageJ, nous permet de calculer l'IC₅₀ de l'héparine : 71.22 μM ($R^2 = 0.2845$) (Figure 25B).

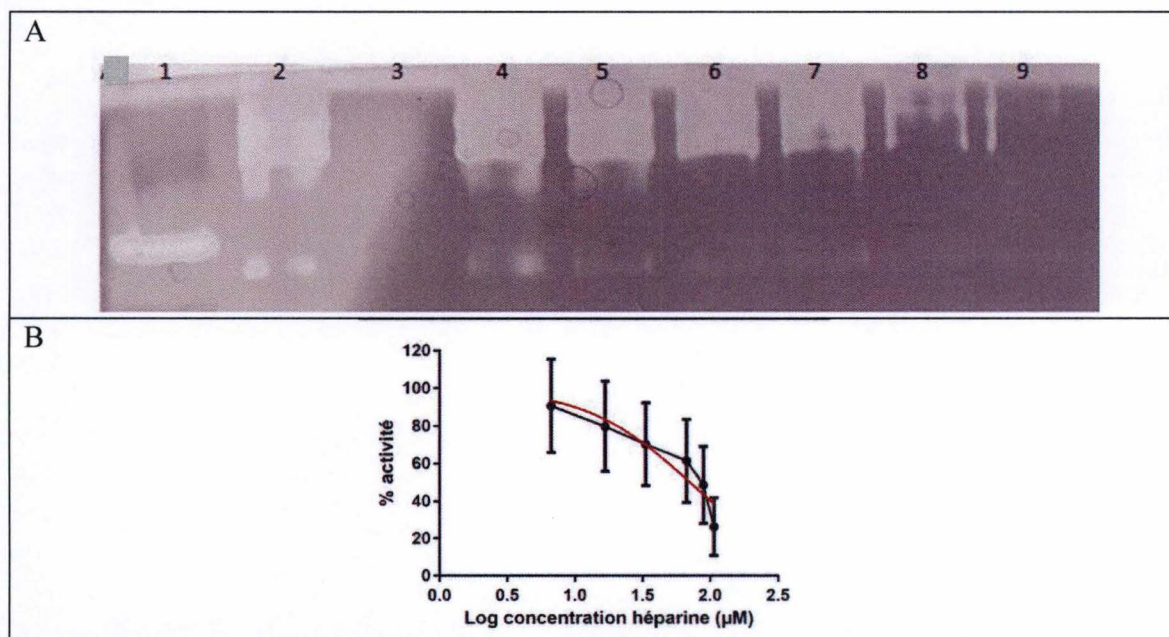


Figure 25 : Inhibition de l'activité HYAL1 par l'héparine. A) Zymographie native (n=3) : rhuHYAL1 (10 ng) + fraction M (2 μg) sans inhibiteur (2) et avec 252.75 μM (4), 421.25 μM (5), 842.50 μM (6), 1685 μM (7), 2246.68 μM (8) et 2696.01 μM (9) d'héparine ; sérum de souris WT (1 μl) (1), héparine seule (2696.01 μM) (3). B) Quantification de l'inhibition de la rhuHYAL1 par ImageJ ; activité exprimée en % de l'activité basale (n=3). Analyse statistique : régression non linéaire, log inhibiteur vs réponse normalisée (Graphpad) : IC₅₀ = 71.22 μM ; $R^2 = 0.2805$.

Mesure de l'inhibition de l'activité HYAL1 par l'hyaluromycine en zymographie

L'hyaluromycine n'étant pas hydrosoluble et sachant que le DMSO ne perturbe pas l'activité de HYAL1 en dessous de 2 μl (20%) en zymographie (Figure 19), le produit étant disponible en quantité limitées, nous avons directement testé des concentrations plus élevées d'hyaluromycine.

Nous avons testé des concentrations d'hyalurmomycine (Figure 26), de 166 μM , 1658 μM et 4145 μM . Une diminution de l'activité totale des deux bandes est visible à 1658 μM (Figure 26A, piste 5). L'IC₅₀ calculé via quantification par imageJ est de 1,5 mM ($R^2 : 0.9681$) (Figure 26B).

Test des inhibiteurs sur l'activité HYAL1 endogène de cellules T47D

Afin de vérifier l'efficacité des inhibiteurs dans un contexte moléculaire plus proche de l'*in vivo*, nous avons planifié de tester les inhibiteurs sur du lysat de cellules exprimant HYAL1 à un niveau détectable en zymographie.

Dans un premier temps, les cellules T47D ont été lysées dans un tampon sucrose imidazole, et 10 μg , 20 μg , 30 μg , 40 μg et 80 μg de protéines ont été chargées sur gel pour

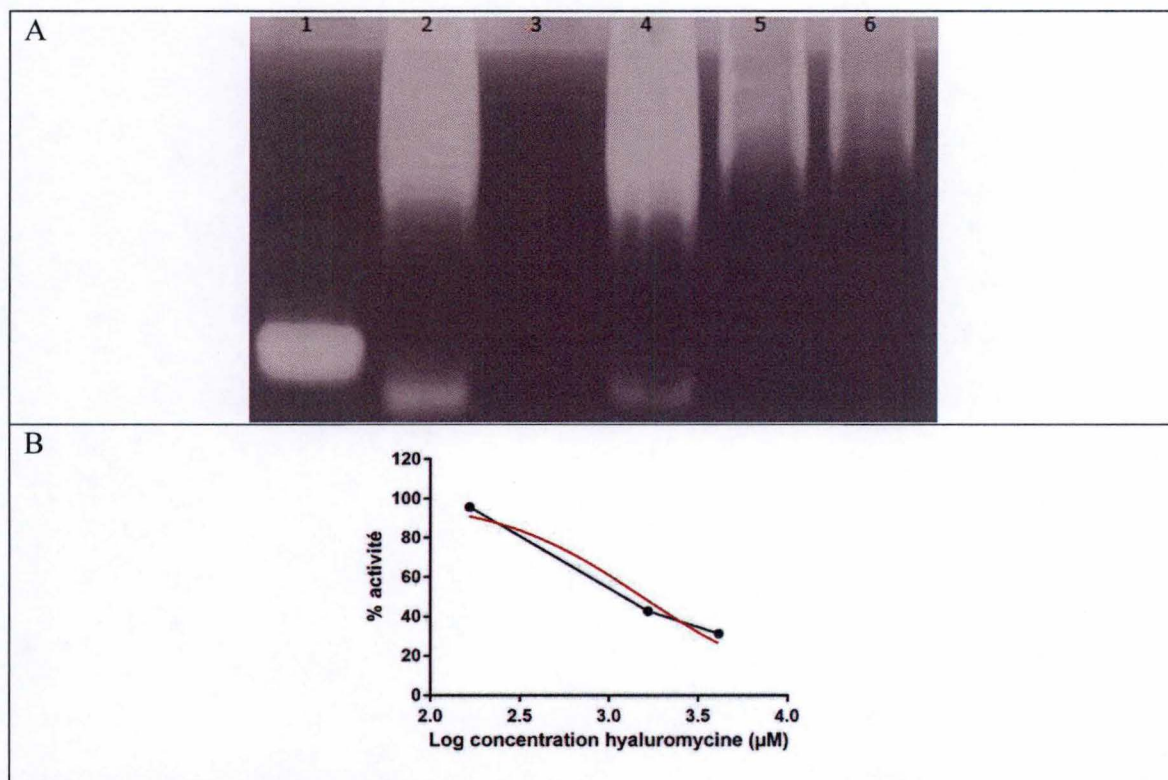


Figure 26 : Inhibition de l'activité HYAL1 par la hyaluronidase. A) Zymographie native (n=1) : rhuHYAL1 (10 ng) + fraction M (2 µg) sans inhibiteur (2) et avec 165.79 µM (4), 1657.86 µM (5) et 4144.63 µM de hyaluronidase ; sérum de souris WT (1 µl) (1), hyaluronidase seule (165.79 µM) (3). B) Quantification de l'inhibition de la rhuHyal1 par ImageJ ; activité exprimée en % de l'activité basale (n=1). Analyse statistique : régression non linéaire, log inhibiteur vs réponse normalisée (Graphpad) : IC50 = 1543 µM ; R² = 0.9861.

analyse en zymographie en condition native (Figure 27). Une activité est observée pour chacune des quantités. Néanmoins une seule bande est visible en haut du gel et correspond à l'agrégat ou dimère décrit précédemment. Le signal est probablement trop faible pour que l'on puisse observer la bande inférieure (sous 80kDa) qui correspond à la forme précurseur de l'enzyme. Nous avons décidé d'utiliser 40 µg de protéines de lysat cellulaire pour la suite des analyses (Figure 27A).

Les différents inhibiteurs ont été additionnés au lysat cellulaire. La concentration choisie pour chaque inhibiteur est la plus élevée utilisée précédemment sur le mix HYAL1 avant d'obtenir une réponse tout ou rien dans un premier temps. Pour l'hyaluronidase, cependant, la quantité disponible étant restreinte, nous ne l'avons pas testé sur le lysat. La Figure 27 B montre une inhibition de l'activité pour chacun des inhibiteurs testés. Cette étape confirme leur efficacité malgré la présence d'autres protéines dans l'échantillon. D'autres analyses, utilisant des quantités croissantes d'inhibiteurs, devront être réalisées afin de déterminer l'IC50 dans ces conditions.

Analyse de l'inhibition de la rhuHYAL1 par zymographie inverse

Dans un troisième temps, nous avons testé la zymographie inverse, qui consiste à faire migrer l'inhibiteur dans le gel et faire agir l'enzyme par l'extérieur. Pour cela nous avons chargé plusieurs quantités de GA, allant de 0.5 µg à 20µg. Après l'électrophorèse, le gel a été incubé dans une tampon pH 3.7 contenant 2.05 µg de rhuHYAL1 par ml + 20 µg de fraction M.

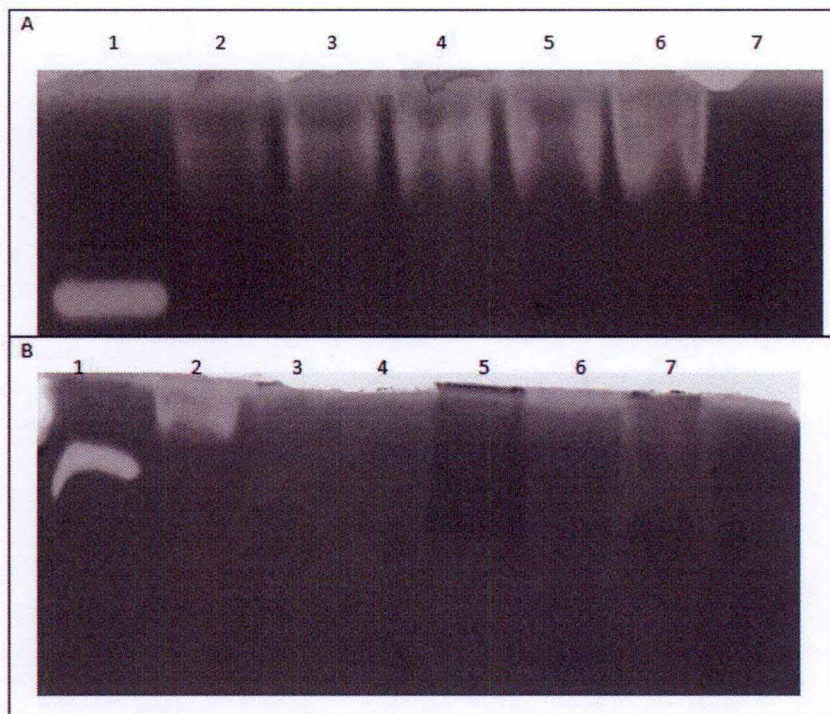


Figure 27 : Activité hyaluronidasique de lysat de cellules T47D en zymographie native. A) activité de 10µg (2), 20 µg (3), 30 µg (4), 40 µg (5) et 80 µg de lysat cellules T47D (6). Sérum de souris WT (1) contrôle positif ; tampon de lyse seul (7) contrôle négatif. B) Activité en présence d'inhibiteurs : 40µg de lysat cellulaire seul (2) ou avec 50 µg de Vc pal (3), 25 µg de HA-S 350 kDa (4), 50 µg de HA-S 13 kDa (5), 20 µg de HA6-C22 (6) et 25 µg d'héparine (7). Contrôles : sérum WT de souris (1), (n=2).

Une autre forme de zymographie inverse a été testée, et consiste à placer un morceau de gel de polyacrylamide contenant HA (1mg/ml) en contact avec la rhuHYAL1 et de l'inhibiteur, dans un tampon adapté aux conditions nécessaires à activité de l'enzyme

Dans les deux cas, aucune activité HYAL1 n'a pu être mise en évidence et les essais n'ont pas été renouvelés.

Analyse de l'activité hyaluronidase par électrophorèse de fragments d'oligosaccharides de HA après digestion

Enfin, un quatrième type de test d'activité hyaluronidasique a été utilisé afin d'appuyer les résultats : la migration et visualisation de produits de dégradation du HA (oligosaccharides) sur gel d'acrylamide.

Dans un premier temps, et pour mettre au point les conditions du test, nous avons utilisé la Bovine Testicular Hyaluronidase (BHT) qui induit la formation d'oligosaccharides de différentes tailles correspondant à la dégradation du HA (Figure 28, piste 2). Cette condition a été réutilisée lors de tests postérieurs comme contrôle positif. Par cette technique, l'inhibition de la BTH par le GA a pu être confirmée (piste 3 et 4).

Lors de la dégradation du HA par la rhuHYAL1 (seule), les conditions testées ont montré une disparition complète du HA sans trace des fragments intermédiaires (Figure 29, pistes 5 et 6). La technique demande donc à être affinée avant de tester les inhibiteurs mais cet essai confirme pour la première fois l'activité de l'enzyme purifiée rhuHYAL1 seule.

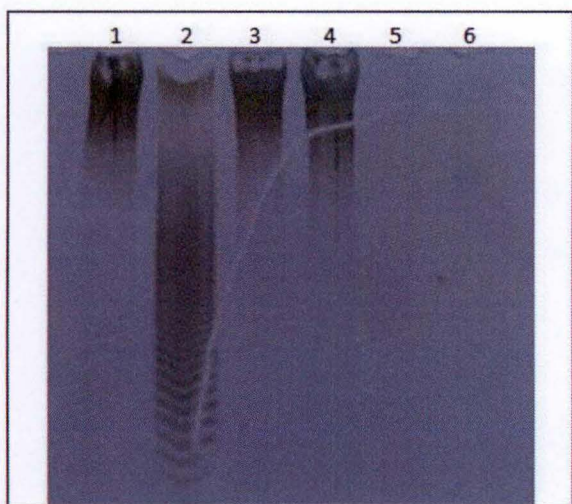


Figure 28: Evaluation de l'activité hyaluronidase de la rhuHYAL1 et de BTH par électrophorèse d'oligosaccharides de HA. 125 µg HA (1) ; dégradation du HA par BTH (5U) (2), BTH + GA 40 µg (3) ou 400 µg de GA (4) après 2 h d'incubation ; dégradation du HA par rhuHYAL1 (20µg) après 2 h (5) et 5 h d'incubation (6)

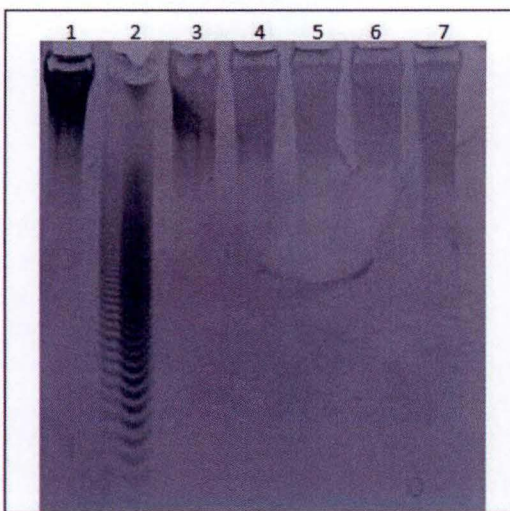


Figure 29 : Evaluation de l'activité hyaluronidasique de différentes quantités de rhuHYAL1. Test 125 µl de HA incubé en présence de 10ng (3), 100ng (4) et 1 µg de rhuHYal1 durant 2h. Contrôles : HA seul (1), 5U de BTH (2)

Quelques essais de mise au point ont été réalisées en modifiant le temps d'incubation ou la quantité d'enzyme. Mais nous ne sommes pas parvenus à obtenir l'échelle de bandes de dégradation attendue.

Discussion

Mise au point

Dans le cadre de ce travail, nous avons testé huit inhibiteurs et disposons de trois techniques de mesure de l'activité hyaluronidasique, à savoir le test de Reissig, la zymographie et l'électrophorèse de fragments de HA après digestion par la rhuHYAL1. Parmi les techniques que nous avons utilisées, deux se sont révélées utilisables pour pouvoir faire l'analyse des capacités inhibitrices des différents inhibiteurs.

Test de Reissig

Le test de Reissig consiste en une réaction colorimétrique entre le résultat de la dégradation du HA, la N-acétylglucosamine, et le DMAB. Cette technique comporte des limitations. En effet, la réaction doit se produire dans un volume final de 130 μ l dont une partie (71.6 μ l) correspond au mix Reissig (HA, tampon formate et NaCl) laissant un peu plus de la moitié du volume pour pouvoir tester différentes conditions. Cependant, l'activité de la rhuHYAL1 seule ne suffit pas à donner un signal suffisant pour être analysé. Afin d'augmenter le signal de la rhuHYAL1, nous avons rajouté 20 μ g de fraction M pour pouvoir atteindre un signal similaire à celui de 5 μ l de sérum de souris WT. L'augmentation du signal lors de l'ajout de la fraction M n'est pas liée à la présence d'hexosamines (contenues dans les lysosomes) mais bien par une activité de HYAL1. En effet, cette activité de la fraction M peut être démontrée par le fait qu'en présence d'un inhibiteur de HYAL1, le signal mesuré diminue. En outre, il apparaît que la fraction M n'est pas seule responsable de l'activité hyaluronidasique observée puisque le signal obtenu pour la rhuHYAL1 et la fraction M est supérieur à celui obtenu pour la fraction M seule. Cet effet d'augmentation (boost) de l'activité de la rhuHYAL1 est spécifique au contenu de la fraction M ; 20 μ g de BSA ou de protéines sériques de souris KO HYAL1^{-/-} ne montre pas d'augmentation du signal. Comme condition expérimental nous avons donc utilisé un mix : 10 ng de rhuHYAL1 + 20 μ g de fraction M, contenant l'inhibiteur ou non.

Zymographie

Chez la souris, il est prouvé que la forme clivée de HYAL1 est moins active en condition renaturante qu'en condition native. Il est probable que cette baisse d'activité en condition renaturante affecte aussi HYAL1 humaine, c'est pourquoi nous avons utilisé la zymographie en condition native. Cette technique présente des limitations concernant le volume de charge ne pouvant pas dépasser 30 μ l. De plus la présence de 2 μ g de fraction M est nécessaire afin de stimuler la rhuHYAL1 et visualiser son activité. Les conditions utilisées en zymographies sont : un gel de polyacrylamide (10%) contenant du HA (1 mg/ml) sur lequel sont chargés 10 ng d'enzyme + 2 μ g de fraction M ; avec ou sans l'inhibiteur. Lors de nos expérimentations, nous avons pu observer la formation de deux bandes d'activité, une bande supérieure dans les environs de 120 kDa et une bande inférieure dans les environs de 60 kDa. La bande supérieure pourrait correspondre à l'agrégation en dimères de HYAL1 ; dimères potentiellement composés soit : 1) de rhuHYAL1 seulement, pouvant regrouper la forme mature et précurseur de rhuHYAL1, 2) de HYAL1 provenant de la fraction M de foie de rat, 3) de rhuHYAL1 et de HYAL1 de la fraction M. La bande inférieure quant à elle correspond à la forme précurseur de la rhuHYAL1 (57-59 kDa).

Migration de fragments de HA post digestion

L'électrophorèse de fragments de HA post digestion réalisée dans le cadre de ce travail a permis l'observation d'une activité de la rhuHYAL1. Cependant, il reste encore des mises au point à faire pour éviter la dégradation totale du HA (disparition) et observer une échelle de produits de dégradation (Table 7).

Table 7 : Tableau récapitulatif des résultats de la migration de fragments de HA

Inhibiteurs	Migration de fragments de HA après digestion
Acide glycyrrhizique (AG)	Efficacité montrée sur la BTH
Autres inhibiteurs	Mise au point de la technique pour rhuHYAL1 à poursuivre.

Inhibition de l'activité de HYAL1

Parmi les inhibiteurs que nous avons testés, Vc pal, l'AG et l'hyaluromycine sont déjà connus pour inhiber l'activité hyaluronidasique. Il a été montré que le GA est en mesure d'inhiber l'activité de la BTH (IC50 = 26 µM). Comme c'est le cas pour le GA, Vc pal est connu pour pouvoir inhiber l'activité hyaluronidasique comme : 1) HYAL1 humaine exprimée par

Table 8 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour les différents inhibiteurs testés via le test de Reissig et via la zymographie.

Inhibiteurs	Reissig		Zymographie	
	IC 50	n	IC 50	n
Acide glycyrrhizique (AG)	IC50 : 84,64 µM, R² = 0,6204	3	N/A	3
Vc pal	IC50 : 790.7 µM, R² = 0.5379	3	IC50 = 8.349 mM, R² = 0,8673	1
HA-S 350 kDa	IC50 : 0.2176 µM, R² = 0.8993	3	IC50 : 2.827 µM, R² = 0,514	3
HA-S 13 kDa	N/A	3	IC50 = 51.32 µM, R² = 0,8414	3
Héxamère HA-S C16	N/A	3	N/A	3
Héxamère HA-S C22	N/A	3	IC50 : 175.9 µM, R² = 0,8756	3
Héparine	IC50 : 1.559 µM, R² = 0.9698	3	IC50 : 71.22 µM, R² = 0.2805	3
Hyaluromycine	IC50 : 593,9µM, R² = 0.8332	1	IC50 : 1543 µM, R² = 0.9861	1

des cellules d'insecte (Ds-2) avec un IC₅₀ de supérieur à 50 μ M ; 2) la BTH avec un IC₅₀ de 56 μ M ; 3) La HYAL Lyase (*Streptococcus agalctiae*) avec un IC₅₀ de 4 μ M. L'hyaluronomycine testée sur la BTH montre un IC₅₀ de 14 μ M. Il est à noter que les IC₅₀ varient en fonction de la technique utilisée et du rapport enzyme-inhibiteur qui n'est pas toujours connu.

L'acide glycyrrhizique (AG)

Nous avons pu démontrer que le GA est capable d'inhiber l'activité de HYAL1 grâce au test de Reissig avec un IC₅₀ de 84.64 μ M (tableau 2) soit un IC₅₀ environ 3 fois plus important que pour la BTH (52). L'électrophorèse des fragments de HA après digestion a confirmé l'inhibition de BTH, comme montré par l'absence de bandes de dégradation de HA. Cependant nous n'avons pas pu confirmer sa capacité inhibitrice par zymographie. Bien que nous n'en connaissions pas la cause, il est probable que dans les conditions expérimentales de la zymographie native ou renaturante, l'interaction entre l'enzyme et l'inhibiteur ne soit pas maintenue empêchant alors l'inhibition de l'enzyme HYAL1.

L'acide L ascorbique 6 palmitate (Vc pal)

Nous avons également pu confirmer l'inhibition de HYAL1 par Vc pal, que ce soit pour le test de Reissig (IC₅₀ de 760,7 μ M) ou pour la zymographie (IC₅₀ de 8.343 mM) (Tableau 2). Néanmoins, les valeurs d'IC₅₀ obtenues sont très éloignées de celle décrites pour HYAL1 humaine exprimée en cellules d'insecte où l'IC₅₀ était proche de 50 μ M. Contrairement au GA, l'inhibition par Vc pal a pu être observée en zymographie, peut être suite à la présence de la chaîne carbonée (palmitate) greffée à la vitamine C. En effet cette chaîne semble s'intégrer au sein d'un site proche du site catalytique (36). La chaîne carbonée permettrait au Vc pal de rester lié à l'enzyme durant l'électrophorèse et les étapes de zymographies. L'équipe d'Armin Buschauer a testé, par turbidimétrie, plusieurs tailles de chaînes carbonées greffées sur la vitamine C et a pu constater que : 1) si la chaîne est inférieure à 12 carbones (laurate) l'IC₅₀ diminue lorsque la taille de la chaîne augmente 2) au-delà de 12 carbones, l'IC₅₀ augmente lorsque la chaîne carbonée s'allonge (38).

Les HA sulfatés 13 kDa, 350 kDa et hexamère palmitate et hexamère de HA-sulfaté béhénate

L'inhibiteur HA-S 350 kDa obtenu de la firme Contipro, est un dérivé de HA portant un (ou plusieurs) groupement(s) sulfate(s) (nous n'avons pas l'information concernant le nombre de groupements) et une chaîne carbonée de 16 carbones. Notre étude confirme sa capacité à inhiber HYAL1. En effet, il se révèle efficace aussi bien dans le test de Reissig (IC₅₀ de 0.2176 μ M/ 0.076 μ g/ μ l) et dans la zymographie (2.827 μ M/ 0.99 μ g/ μ l) (tableau 2). Cet inhibiteur tient probablement son potentiel inhibiteur de plusieurs éléments : il s'agit d'un dérivé du substrat originel de l'enzyme ce qui facilite sa liaison au sein du site catalytique ; de par la sulfatation de la molécule, l'hyaluronidase n'est pas en mesure de cliver le HA ; comme c'est le cas pour le Vc pal, la chaîne carbonée permet un ancrage plus fort de l'inhibiteur. Les valeurs d'IC₅₀ sur la BTH obtenues par la firme (de manière globale pour tous les inhibiteurs) sont « 0.008-0.08 μ g/ μ l ». Valeurs correspondant à ce que nous avons pu mesurer pour HYAL1 en Reissig et inférieures à celle qu'on a pu calculer en zymographie mais, ici encore, nous ne connaissons pas la technique utilisée ni le rapport enzyme-inhibiteur.

L'inhibition de HYAL1 par l'inhibiteur HA-S 13 kDa n'a pas pu être mesurée par le test de Reissig suite à une interférence de l'oligosaccharide avec la réaction colorimétrique. Néanmoins, dans le cadre de la zymographie, cette forme de HA portant également un (ou des) groupement(s) sulfate(s) et une chaîne carbonée (16C) est un bon inhibiteur potentiel de la rhuHYAL1. L'IC₅₀ calculé pour l'activité globale est de 51.32 μ M (0,69 μ g/ μ l) (tableau 2) soit une valeur bien supérieure à celle fournie par Contipro.

Ensuite des hexamères de HA- sulfatés ont été testés. Soit un hexamère de HA-S portant une chaîne de 16 carbones (palmitate), soit un hexamère de HA-S portant une chaîne de 22 carbones (béhénate). En Reissig, aucun de ces deux inhibiteurs n'a pu être testé suite au problème d'interférence déjà rencontré pour le HA-S 13 KDa. En zymographie, seule la forme portant la chaîne béhénate inhibe la rhuHYAL1 avec un IC₅₀ de 175.9 μ M /0.52 μ g/ μ l (tableau 2). Soit des valeurs plus élevées que celle obtenues par Contipro. L'hexamère de HA-S portant la chaîne palmitate ne montre pas d'inhibition de l'activité de la rhuHYAL1, malgré la présence de la chaîne carbonée qui devrait faciliter l'ancrage de la molécule au sein de l'enzyme. Il semble donc qu'une chaîne carbonée plus longue assure un meilleur ancrage de l'inhibiteur au sein de l'enzyme. Les résultats de l'équipe d'Armin Bushauer sur HYAL1 montraient la meilleure inhibition pour Vc portant une chaîne de 12 carbones mais la longueur maximale testée dans leur étude est une chaîne C15 (38).

L'héparine

En ce qui concerne l'héparine, connue pour inhiber l'activité de la hyaluronidase (38). L'héparine nous a été fournie par Contipro et comme aucun détail sur le poids ne nous a été communiqué, nous avons basé nos calculs sur le poids moyen de l'héparine qui est de 15 kDa. Nous avons également pu montrer que cette molécule inhibe la rhuHYAL1 dans nos conditions expérimentales. Un IC₅₀ de 1.559 μ M (0.023 μ g/ μ l) a été calculé pour le test de Reissig, et de 71.22 μ M (1.07 μ g/ μ l) pour la zymographie (tableau 2). Contipro a mesuré un IC₅₀ (sur la BTH) de 0.002 μ g/ μ l. Les valeurs d'IC₅₀ que nous avons obtenues pour le Reissig et pour la zymographie sont supérieures. Cependant nous ne connaissons pas la technique utilisée et il ne s'agit pas du même enzyme, d'où les différences d'IC₅₀ observables.

L'hyaluromycine

Enfin nous avons pu analyser les capacités inhibitrices de l'hyaluromycine sur l'activité de la rhuHYAL1. L'hyaluromycine a été purifiée et nous a été gracieusement donnée par le professeur Yasuhiro Igarashi. Faute de quantité, les tests n'ont pu être réalisés qu'une seule fois. Un IC₅₀ de 594 μ M (0,3582 μ g/ μ l) a été calculé pour le test de Reissig, et un IC₅₀ de 1543 μ M en zymographie (tableau 2). La valeur calculée en Reissig est très éloignée de celle décrite pour la BTH (14 μ M) et il en est de même pour l'IC₅₀ calculé par zymographie. Le pouvoir inhibant de l'hyaluromycine sur HYAL1 n'a jamais été calculé au préalable, mais a été suggérée comme inhibiteur de HYAL1 lors d'une étude sur la prolifération et la migration de cellules cancéreuses. En effet, l'équipe de Shiro Kohi a pu montrer une diminution de la production de LMW-HA par les cellules cancéreuses en présence d'hyaluromycine. De plus amples études sont nécessaires pour prouver son utilisation en thérapie anticancéreuse (41).

L'effet des inhibiteurs sur le lysat cellulaire de cellules T47D

Afin de vérifier les inhibiteurs dans le contexte protéique « normal » de HYAL1, nous les avons testés (hormis l'hyaluronomycine) sur le lysat de cellules cancéreuses T47D qui surexpriment l'enzyme. Tous les inhibiteurs ont pu inhiber l'activité hyaluronidasique détectable en zymographie, dans ces conditions, et ne semblent pas « gênés » par la présence d'autres protéines. Néanmoins, un calcul de l'IC50 est nécessaire afin de déterminer l'impact, ou non, de la présence d'autres protéines sur ces inhibiteurs.

Perspectives

Le but de ce travail était de sélectionner un inhibiteur de HYAL1 et d'analyser ses interactions avec l'enzyme par cristallographie en collaboration avec les chimistes. Cette étape est nécessaire pour pouvoir modifier la molécule afin d'augmenter son affinité pour l'enzyme et injectable *in vivo* sans risquer que l'inhibiteur ne soit dégradé (clivage des chaînes carbonées par les estérases, par exemple). La validation d'inhibiteur de HYAL1 est encourageante pour la suite des recherches puisque l'inhibition de cette enzyme a des conséquences notables sur l'évolution de maladies telles que certaines formes de cancers et le diabète.

Dans un premier temps, il serait intéressant de chercher les meilleures conditions expérimentales afin d'obtenir des résultats exploitables pour la migration de fragments de HA post-digestion afin d'avoir une troisième technique pour confirmer les résultats obtenus précédemment.

Ensuite, l'analyse des inhibiteurs sur un modèle cellulaire est envisagée : analyser l'impact de l'inhibition de la rhuHYAL1 a sur la préservation du glycocalyx endothélial. Pour cela il est envisagé d'utiliser un modèle de barrière endothéliale reconstituée au moyen de cellules endothéliales glomérulaires immortalisées, connues pour former un glycocalyx visualisable (53), *in vitro*. Grâce à ce modèle il est possible d'analyser l'implication du HA, présent dans le glycocalyx, dans le rôle de barrière contre le passage de macromolécules ou protéines. En effet, ce modèle permet de mesurer le passage de l'albumine en fonction de l'intégrité du glycocalyx et donc lors de la dégradation du glycocalyx par l'ajout d'HYAL1 exogène (comme la rhuHYAL1). Les résultats obtenus à l'aide de ce modèle permettront d'évaluer l'inhibition de la rhuHYAL1 par un inhibiteur via la quantification du passage d'albumine (53).

Bien que nous ayons prouvé l'efficacité des différents inhibiteurs au travers des deux techniques que sont le test de Reissig et la zymographie, il reste encore beaucoup à faire pour pouvoir les adapter en une forme de traitement contre l'activité de HYAL1. En collaboration avec l'unité de chimie physique, théorique et structurale, il est prévu d'analyser la structure cristallographique de l'enzyme et de l'inhibiteur sélectionné, afin de déterminer comment celui-ci interagit avec l'enzyme. Il peut agir en tant qu'inhibiteur compétitif en prenant la place du substrat d'origine qui est le HA dans ce cas-ci, ou en tant qu'inhibiteur de conformation. Dans le cas des hyaluronidases, l'ajout d'une chaîne hydrophobe augmente l'affinité des inhibiteurs puisque, proche du site actif de l'enzyme, se trouve une région riche en a.a. hydrophobes. (37).

Ensuite, il serait intéressant d'envisager des modifications de la structure du ou des inhibiteur(s) choisi(s) afin d'augmenter leur spécificité et/ou leur efficacité, par exemple, via ajout d'une chaîne carbonée pour ceux qui n'en ont pas, ou via une modification de la liaison permettant la fixation de la chaîne carbonée afin d'éviter son clivage *in vivo* par les estérases.

La dernière étape serait de tester les différentes molécules modifiées dans un contexte *in vivo*, chez des souris rendues diabétiques afin de vérifier s'il y a bien un effet protecteur pour le glycocalyx.

Bibliographie

- 1) P. W. Noble, J. Liang, et D. Jiang, "Hyaluronan as an immune regulator in human diseases", *Physiol Rev.* 2011 Jan; 91(1): 221–264
- 2) Itano N1, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K, «Three Isoforms of Mammalian Hyaluronan Synthases Have Distinct Enzymatic Properties », *J Biol Chem.* 1999 Aug 27;274(35):25085-92.
- 3) Itano N, Kimata K, «Mammalian Hyaluronan Synthases », *IUBMB Life.* 2002 Oct;54(4):195-9.
- 4) Andrew P. Spicer and John A. McDonald, « Characterization and Molecular Evolution of a Vertebrate Hyaluronan Synthase Gene Family », *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 273, No. 4, Issue of January 23, pp. 1923–1932, 1998
- 5) Triggs-Raine B. and Natowicz M. «Biology of hyaluronan: Insights from genetic disorders of hyaluronan metabolism», *World J Biol Chem.* 2015 Aug 26; 6(3): 110–120.
- 6) S. Salmen, J. Hoechstetter, C. KÄsbauer, D. H. Paper, G. Bernhardt and A. Buschauer, "Sulphated Oligosaccharides as inhibitors of Hyaluronidase from Bovine Testis, Bee Venom and *Streptococcus agalactiae*" *Planta Med.* 2005 ;71(8):727-32.
- 7) Kreil G, «Hyaluronidases -A group of neglected enzymes», *Protein Sci.* 1995 Sep; 4(9): 1666–1669.
- 8) Hertel W, Peschel G, Ozegowski J and Müller P, «Inhibitory Effects of Terpenes and Flavonoids on the Enzymatic Activity of Hyaluronic Acid-Splitting Enzymes», *Arch Pharm* Volume 339, Issue 6 June 2006 Pages 313-318
- 9) Csoka AB, Frost GI, Stern R, «The six hyaluronidase genes in the human and mouse genome», *Matrix Biol.* 2001 Dec;20(8):499-508.
- 10) Hemming R, Martin D, Slominski E, Nagy J, Halayko A, Pind S and Triggs-Raine B «Mouse Hyal3 encodes a 45- to 56-kDa glycoprotein whose overexpression increases hyaluronidase 1 activity in cultured cells», *Glycobiology* vol. 18 no. 4 pp. 280–289, 2008
- 11) Zhang L, Bharadwaj AG, Casper A, Barkley J, Barycki JJ, Simpson MA «Hyaluronidase Activity of Human Hyal 1 Require Active Site Acidic and Tyrosine Residues», *J Biol Chem.* 2009 Apr 3;284(14):9433-42.
- 12) Puissant E, Gilis F, Dogné S, Flamion B, Jadot M, Boonen M «Subcellular Trafficking and Activity of Hyal-1 and Its Processed Forms in Murine Macrophages», *Traffic.* 2014 May;15(5):500-15.
- 13) Marie-Christine Gasingirwa, Jacqueline Thirion, Jeannine Mertens-Strijthagen, Simone Wattiaux-De Coninck, Bruno Flamion, Robert Wattiaux, Michel Jadot, «Endocytosis of hyaluronidase-1 by the liver», *Biochemical Journal* Sep 01, 2010, 430 (2) 305-313; DOI: 10.1042/BJ20100711
- 14) Bourguignon V, Flamion B, «Respective roles of hyaluronidases 1 and 2 in endogenous hyaluronan turnover», *FASEB J.* 2016 Jun;30(6):2108-14
- 15) Singleton PA, «Hyaluronan regulation of vascular integrity», *Adv Cancer Res.* 2014;123:191-209
- 16) Akira Ushiyama, Hanae Kataoka and Takehiko Iijima, "Glycocalyx and its involvement in clinical pathophysiology", *Journal of Intensive Care* (2016) 4:59 DOI 10.1186/s40560-016-0182-z
- 17) L. Gao and H. H. Lipowsky, « Composition of the Endothelial Glycocalyx and its Relation to its Thickness and Diffusion of Small Solutes », *Microvasc Res.* 2010 December ; 80(3) : 394–401
- 18) Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB, «Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover», *J Intern Med.* 1997 Jul;242(1):27-33

- 19) Dogné S, Flamion B, Caron N, « Endothelial Glycocalyx as a Shield Against Diabetic Vascular Complications Involvement of Hyaluronan and Hyaluronidases », *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38: 1427-1439
- 20) F. E. Lennon and P. A. Singleton, « Hyaluronan regulation of vascular integrity », *Am J Cardiovasc Dis* 2011 ;1(3) :200-213
- 21) A.J. Day and C.A. de la Motte, « Hyaluronan cross-linking : a protective mechanism in inflammation ? », *Trends Immunol* 2005 Dec ;26(12) :637-43. Epub 2005 Oct 7.
- 22) Hertel W, Peschel G., Ozegowski JH, Müller PJ., « Inhibitory effects of triterpenes and flavonoids on the enzymatic activity of hyaluronic acid-splitting enzymes ».
- 23) Erickson M, Stern R. « Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism », *Biochem Res Int* 2012; 2012:893947.
- 24) Frank B. Hu « Globalization of Diabetes The role of diet, lifestyle, and genes », *Diabetes Care.* 2011 Jun; 34(6): 1249–1257
- 25) Fédération Française des diabétiques (<https://www.federationdesdiabetiques.org/information/definition-diabete/chiffres-monde>) consulté le 24 juin 2018
- 26) IDF Diabetes Atlas, 8th edn. Brussels, Belgium : International Diabetes Federation, 2017. (<http://www.diabetesatlas.org>), consulté le 24 juin 2018
- 27) S. Dogné, G. Rath, F. Jouret, N. Caron, C. Dessy, B. Flamion, « Hyaluronidase 1 Deficiency Preserves Endothelial Function and Glycocalyx Integrity in Early Streptozotocin-Induced Diabetes », 2016 Sep ;65(9) :2742-53. Doi : 10.2337/db15-1662.
- 28) S. Shakya, Y. Wang, JA. Mack, EV Maytin, « Hyperglycemia-Induced Changes in Hyaluronan Contribute to Impaired Skin Wound Healing in Diabetes : Review and Perspective », *Int J Cell Biol.* 2015;2015:701738. Doi : 10.1155/2015/701738
- 29) Organisation mondiale de la santé (OMS) (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>) (consulté le 27 juin 2018).
- 30) N. Khan, F. Afaq, and H. Mukhtar, "LIFESTYLE AS RISK FACTOR FOR CANCER: EVIDENCE FROM HUMAN STUDIES", *Cancer Lett.* 2010 Jul 28; 293(2): 133–143.
- 31) Institut national du cancer (<http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents>) consulté le 29 juin 2018 (mis à jour le 17 janvier 2018)
- 32) X.B. Cheng, S. Kohi, A. Koga, K. Hirata, N. Sato, « Hyaluronan stimulates pancreatic cancer cell motility », *Oncotarget.* 2016 Jan 26 ;7(4) :4829-40. Doi : 10.18632/oncotarget.6617
- 33) Kohi S, Sato N, Koga A, Hirata K, Harunari E, Igarashi Y., « Hyaluromycin, a Novel Hyaluronidase Inhibitor, Attenuates Pancreatic Cancer Cell Migration and Proliferation », *J Oncol.* 2016 ;2016 :9063087. Doi : 10.1155/2016/9063087. Epub 2016 Dec 20.
- 34) Tan JX, Wang XY, Li HY, Su XL, Wang L, Ran L, Zheng K, Ren GS, « HYAL1 overexpression is correlated with the malignant behavior of human breast cancer », *Int J Cancer* 2011 Mar 15;128(6):1303-15. Doi : 10.1002/ijc.25460.
- 35) C. Fieber, P. Baumann, R. Vallon, C. Termeer, J.C. Simon, M. Hofmann, P. Angel, P. Herrlich, J.P. Sleeman, « Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloprotease » *J Cell Sci.* 2004 Jan 15 ;117(Pt 2) :359-67. Epub 2003 Déc. 2.
- 36) C. O. McAtee, A. R. Berkebile, C. G. Elowsky, T. Fangman, J. J. Barycki, J. K. Wahl 3rd, O. Khalimonchuk, N. Naslavsky, S. Caplan, and M. A. Simpson, « Hyaluronidase Hyal1 Increases Tumor Cell

- Proliferation and Motility through Accelerated Vesicle Trafficking », *J Biol Chem.* 2015 May 22 ;290(21) :13144-56. Doi : 10.1074/jbc.M115.647446. Epub 2015 APR 8.
- 37) Furuya T, Yamagata S, Shimoyama Y, Fujihara M, Morishima N, Ohtsuki K., « Biochemical characterization of glycyrrhizin as an effective inhibitor for hyaluronidases from bovine testis », *Biol Pharm Bull.* 1997 Sep ;20(9) :973-7.
 - 38) Botzki A, Rigden DJ, Braun S, Nukui M, Salmen S, Hoechstetter J, Bernhardt G, Dove S, Jedrzejewski MJ, Buschauer A., « L-Ascorbic acid 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor. X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes », *J Biol Chem.* 2004 Oct 29 ;279(44) :45990-7. Epub 2004 Aug 18.
 - 39) Jones CP, Sawyer RT., « Heparin inhibits mammalian, but not leech, hyaluronidase », *Thromb Res.* 1989 Sep 15 ;55(6) :791-6
 - 40) Salmen S, Hoechstetter J, Käsbauer C, Paper DH, Bernhardt G, Buschauer A., « Sulphated oligosaccharides as inhibitors of hyaluronidases from bovine testis, bee venom and *Streptococcus agalactiae* », *Planta Med.* 2005 Aug ;71(8) :727-32.
 - 41) Harunari E, Imada C, Igarashi Y, Fukuda T, Terahara T, Kobayashi T., « Hyaluromycin, a new hyaluronidase inhibitor of polyketide origin from marine *Streptomyces* sp », *Mar Drugs.* 2014 Jan 21 ;12(1) :491-507. Doi : 10.3390/md12010491.
 - 42) José L. Reissig, Jack L. Strominger and Luis F. Leloir, "A MODIFIED COLORIMETRIC METHOD FOR THE ESTIMATION OF N-ACETYLAMINO SUGARS", *J. Biol. Chem.* 1955, 217 :959-966.
 - 43) Olivier Biner, Christian Trachsel, Aline Moser, Lukas Kopp, Nicolas Langenegger, Urs Kämpfer, Christoph von Ballmoos, Wolfgang Nentwig, Stefan Schürch, Johann Schaller, and Lucia Kuhn-Nentwig, "Isolation, N-glycosylations and Function of a Hyaluronidase-Like Enzyme from the Venom of the Spider *Cupiennius salei*", *PLoS One.* 2015 ; 10(12) : e0143963
 - 44) Y. Kusayama, Y. Akamatsu, K. Kumagai, H. Kobayashi, M. Aratake, and T. Saito, "Changes in synovial fluid biomarkers and clinical efficacy of intra-articular injections of hyaluronic acid for patients with knee osteoarthritis", *J Exp Orthop.* 2014 Dec ; 1 : 16.
 - 45) Ertugrul Kiykim, Kenan Barut, Mehmet Serif Cansever, Cigdem Aktuglu Zeybek, Tanyel Zubarioglu, Ahmet Aydin, and Ozgur Kasapcopur, "Screening Mucopolysaccharidosis Type IX in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis", *JIMD Rep.* 2016 ; 25 : 21–24
 - 46) Puissant E, Gilis F, Dogné S, Flamion B, Jadot M, Boonen M., « Subcellular trafficking and activity of Hyal-1 and its processed forms in murine macrophages », *Traffic.* 2014 May ;15(5) :500-15.
 - 47) Kazuhiro Mio, Antonei B. Csóka, Susan Stair Nawy, and Robert Stern, "Detecting Hyaluronidase and Hyaluronidase Inhibitors Hyaluronan-Substrate Gel and -Inverse Substrate Gel Techniques", *Methods in Molecular Biology* · February 2001, 171 :391-7.
 - 48) Mayumi Ikegami-Kawai, Tomoko Takahashi, "Microanalysis of hyaluronan oligosaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis and its application to assay of hyaluronidase activity", *Analytical Biochemistry* Volume 311, Issue 2, 15 December 2002, Pages 157–165
 - 49) Boonen M, Puissant E, Gilis F, Flamion B, Jadot M. « Mouse liver lysosomes contain enzymatically active processed forms of Hyal-1. », *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Apr 18 ;446(4) :1155-60.
 - 50) Isoyama T, Thwaites D, Selzer M, Carey R, Barbucci R, Lokeshwar V, « Differential selectivity of hyaluronidase inhibitors toward acidic and basic hyaluronidases », *Glycobiology*, Volume 16, Issue 1, 1 January 2006, Pages 11–21
 - 51) Maingonnat C, Victor R, Bertrand P, Courel M-N, Maunoury R, Delpech B, « Activation and Inhibition of Human Cancer Cell Hyaluronidase by Proteins », *Analytical Biochemistry* Volume 268, Issue 1, 1 March 1999, Pages 30-34

- 52) Hofinger ES, Spickenreither M, Oschmann J, Bernhardt G, Rudolph R, Buschauer A., « Recombinant human hyaluronidase Hyal-1 : insect cells versus Escherichia coli as expression system and identification of low molecular weight inhibitors. », *Glycobiology*. 2007 Apr ;17(4) :444-53. Epub 2007 Jan 16.
- 53) A. Singh, V. Fridén, I. Dasgupta, R. R. Foster, G. I. Welsh, J. E. Tooke, B. Haraldsson, P. W. Mathieson, and S. C. Satchell, "High glucose causes dysfunction of the human glomerular endothelial glycocalyx", *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011 Jan ; 300(1): F40–F48.